

# ENGINEERING OF BIOMATERIALS

INŻYNIERIA BIOMATERIAŁÓW

JOURNAL OF POLISH SOCIETY FOR BIOMATERIALS AND FACULTY OF MATERIALS SCIENCE AND CERAMICS AGH-UST  
ZASOPISMO POLSKIEGO STOWARZYSZENIA BIOMATERIAŁÓW I WYDZIAŁU INŻYNIERII MATERIAŁOWEJ I CERAMIKI AGH

**Number 105**

Numer 105

**Volume XIV**

Rok XIV

**OCTOBER 2011**

PAŹDZIERNIK 2011

**ISSN 1429-7248**

**PUBLISHER:**

WYDAWCA:

**Polish Society  
for Biomaterials  
in Krakow**

Polskie  
Stowarzyszenie  
Biomateriałów  
w Krakowie

**EDITORIAL  
COMMITTEE:**

KOMITET  
REDAKCYJNY:

**Editor-in-Chief**

Redaktor naczelny  
**Jan Chłopek**

**Editor**

Redaktor  
**Elżbieta Pamuła**

**Secretary of editorial**

Sekretarz redakcji

**Design**

Projekt  
**Katarzyna Trała**  
**Augustyn Powroźnik**

**ADDRESS OF**

**EDITORIAL OFFICE:**

ADRES REDAKCJI:

**AGH-UST**

**30/A3, Mickiewicz Av.**  
**30-059 Krakow, Poland**

Akademia

Górnicz-Hutnicza  
al. Mickiewicza 30/A-3  
30-059 Kraków

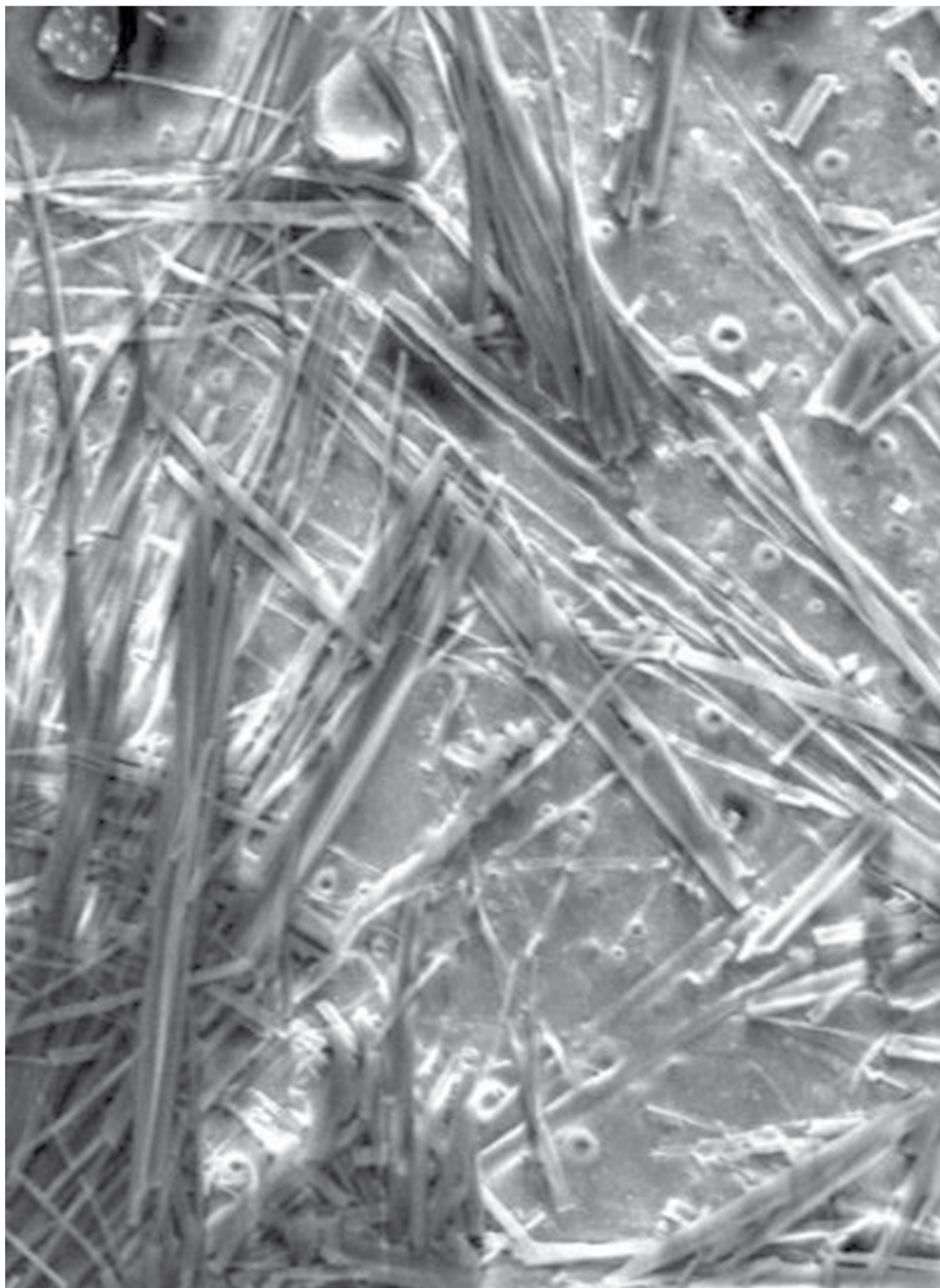
**Issue: 200 copies**

Nakład: 200 egz.

**Scientific Publishing  
House AKAPIT**

Wydawnictwo Naukowe  
AKAPIT

e-mail: [wn@akapit.krakow.pl](mailto:wn@akapit.krakow.pl)



**INTERNATIONAL EDITORIAL BOARD**  
**MIĘDZYNARODOWY KOMITET REDAKCYJNY**

**Iulian Antoniac**

UNIVERSITY POLITEHNICA OF BUCHAREST, ROMANIA

**Lucie Bacakova**

ACADEMY OF SCIENCE OF THE CZECH REPUBLIC, PRAGUE, CZECH REPUBLIC

**Romuald Będziński**

POLITECHNIKA WROCŁAWSKA / WROCLAW UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

**Marta Błażewicz**

AKADEMIA GÓRNICZO-HUTNICZA, KRAKÓW / AGH UNIVERSITY OF SCIENCE AND TECHNOLOGY, KRAKOW

**Stanisław Błażewicz**

AKADEMIA GÓRNICZO-HUTNICZA, KRAKÓW / AGH UNIVERSITY OF SCIENCE AND TECHNOLOGY, KRAKOW

**Maria Borczuch-Łączka**

AKADEMIA GÓRNICZO-HUTNICZA, KRAKÓW / AGH UNIVERSITY OF SCIENCE AND TECHNOLOGY, KRAKOW

**Wojciech Chrzanowski**

UNIVERSITY OF SYDNEY, AUSTRALIA

**Tadeusz Cieślik**

ŚŁĄSKI UNIWERSYTET MEDYCZNY / MEDICAL UNIVERSITY OF SILESIA

**Jan Ryszard Dąbrowski**

POLITECHNIKA BIAŁOSTOCKA / BIAŁYSTOK TECHNICAL UNIVERSITY

**Andrzej Górecki**

WARSZAWSKI UNIWERSYTET MEDYCZNY / MEDICAL UNIVERSITY OF WARSAW

**Robert Hurt**

BROWN UNIVERSITY, PROVIDENCE, USA

**James Kirkpatrick**

JOHANNES GUTENBERG UNIVERSITY, MAINZ, GERMANY

**Wojciech Maria Kuś**

WARSZAWSKI UNIWERSYTET MEDYCZNY / MEDICAL UNIVERSITY OF WARSAW

**Małgorzata Lewandowska-Szumieł**

WARSZAWSKI UNIWERSYTET MEDYCZNY / MEDICAL UNIVERSITY OF WARSAW

**Jan Marcinia**

POLITECHNIKA ŚLĄSKA / SILESIAN UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

**Sergey Mikhalovsky**

UNIVERSITY OF BRIGHTON, UNITED KINGDOM

**Stanisław Mitura**

POLITECHNIKA ŁÓDZKA / TECHNICAL UNIVERSITY OF LODZ

**Roman Pampuch**

AKADEMIA GÓRNICZO-HUTNICZA, KRAKÓW / AGH UNIVERSITY OF SCIENCE AND TECHNOLOGY, KRAKOW

**Stanisław Pielka**

AKADEMIA MEDYCZNA WE WROCŁAWIU / WROCLAW MEDICAL UNIVERSITY

**Vehid Salih**

UCL EASTMAN DENTAL INSTITUTE, UNITED KINGDOM

**Jacek Składzień**

UNIWERSYTET JAGIELLOŃSKI, COLLEGIUM MEDICUM, KRAKÓW / JAGIELLONIAN UNIVERSITY, COLLEGIUM MEDICUM, KRAKOW

**Andrei V. Stanishevsky**

UNIVERSITY OF ALABAMA AT BIRMINGHAM, USA

**Anna Ślósarczyk**

AKADEMIA GÓRNICZO-HUTNICZA, KRAKÓW / AGH UNIVERSITY OF SCIENCE AND TECHNOLOGY, KRAKOW

**Tadeusz Trzaska**

AKADEMIA WYCHOWANIA FIZYCZNEGO, POZNAŃ / UNIVERSITY SCHOOL OF PHYSICAL EDUCATION, POZNAŃ

**Dimitris Tsipas**

ARISTOTLE UNIVERSITY OF THESSALONIKI, GREECE

## Wskazówki dla autorów

1. Prace do opublikowania w kwartalniku „Engineering of Biomaterials / Inżynieria Biomateriałów” przyjmowane będą wyłącznie z tłumaczeniem na język angielski. Obcokrajowców obowiązuje tylko język angielski.
2. Wszystkie nadsyłane artykuły są recenzowane.
3. Materiały do druku prosimy przysyłać na adres e-mail: kabe@agh.edu.pl.
4. Struktura artykułu:
  - TYTUŁ • Autorzy • Streszczenie (100-200 słów) • Słowa kluczowe • Wprowadzenie • Materiały i metody • Wyniki i dyskusja • Wnioski • Podziękowania • Piśmiennictwo
5. Materiały ilustracyjne powinny znajdować się poza tekstem w oddzielnych plikach (format .jpg, .gif, .tiff, .bmp). Rozdzielczość rysunków min. 300 dpi. Wszystkie rysunki i wykresy powinny być czarno-białe lub w odcieniach szarości i ponumerowane cyframi arabskimi. W tekście należy umieścić odnośniki do rysunków i tabel. W tabelach i na wykresach należy umieścić opisy polskie i angielskie. W dodatkowym dokumencie należy zamieścić spis tabel i rysunków (po polsku i angielsku).
6. Na końcu artykułu należy podać wykaz piśmiennictwa w kolejności cytowania w tekście i kolejno ponumerowany.
7. Redakcja zastrzega sobie prawo wprowadzenia do opracowań autorskich zmian terminologicznych, poprawek redakcyjnych, stylistycznych, w celu dostosowania artykułu do norm przyjętych w naszym czasopiśmie. Zmiany i uzupełnienia merytoryczne będą dokonywane w uzgodnieniu z autorem.
8. Opinia lub uwagi recenzenta będą przekazywane Autorowi do ustosunkowania się. Nie dostarczenie poprawionego artykułu w terminie oznacza rezygnację Autora z publikacji pracy w naszym czasopiśmie.
9. Za publikację artykułów redakcja nie płaci honorarium autorskiego.
10. Adres redakcji:

### Czasopismo

„Engineering of Biomaterials / Inżynieria Biomateriałów”  
Akademia Górniczo-Hutnicza im. St. Staszica  
Wydział Inżynierii Materiałowej i Ceramiki  
al. Mickiewicza 30/A-3, 30-059 Kraków

tel. (48 12) 617 25 03, 617 25 61  
tel./fax: (48 12) 617 45 41  
e-mail: chlopek@agh.edu.pl, kabe@agh.edu.pl

www.biomat.krakow.pl

## Warunki prenumeraty

Zamówienie na prenumeratę prosimy przysyłać na adres:  
apowroz@agh.edu.pl, tel/fax: (48 12) 617 45 41  
Konto:  
Polskie Stowarzyszenie Biomateriałów  
30-059 Kraków, al. Mickiewicza 30/A-3  
Bank Śląski S.A. O/Kraków,  
nr rachunku 63 1050 1445 1000 0012 0085 6001  
Opłaty: cena pojedynczego numeru wynosi 20 PLN

## Instructions for authors

1. Papers for publication in quarterly magazine „Engineering of Biomaterials / Inżynieria Biomateriałów” should be written in English.
2. All articles are reviewed.
3. Manuscripts should be submitted to Editor's Office by e-mail to kabe@agh.edu.pl.
4. A manuscript should be organized in the following order:
  - TITLE • Authors and affiliations • Abstract (100-200 words) • Keywords (4-6) • Introduction • Materials and methods • Results and discussions • Conclusions • Acknowledgements • References
5. Authors' full names and affiliations with postal addresses should be given. If authors have different affiliations use superscripts 1,2...
6. All illustrations, figures, tables, graphs etc. preferably in black and white or grey scale should be presented in separate electronic files (format .jpg, .gif, .tiff, .bmp) and not incorporated into the Word document. High-resolution figures are required for publication, at least 300 dpi. All figures must be numbered in the order in which they appear in the paper and captioned below. They should be referenced in the text. The captions of all figures should be submitted on a separate sheet.
7. References should be listed at the end of the article. Number the references consecutively in the order in which they are first mentioned in the text.
8. Opinion or notes of reviewers will be transferred to the author. If the corrected article will not be supplied on time, it means that the author has resigned from publication of work in our magazine.
9. Editorial does not pay author honorarium for publication of article.
10. Papers will not be considered for publication until all the requirements will be fulfilled.
11. Manuscripts should be submitted for publication to:

### Journal

„Engineering of Biomaterials / Inżynieria Biomateriałów”  
AGH University of Science and Technology  
Faculty of Materials Science and Ceramics  
30/A-3, Mickiewicz Av., 30-059 Krakow, Poland

tel. (48 12) 617 25 03, 617 25 61  
tel./fax: (48 12) 617 45 41  
e-mail: chlopek@agh.edu.pl, kabe@agh.edu.pl

www.biomat.krakow.pl

## Subscription terms

Subscription rates:  
Cost of one number: 20 PLN  
Payment should be made to:  
Polish Society for Biomaterials  
30/A3, Mickiewicz Av.  
30-059 Krakow, Poland  
Bank Slaski S.A. O/Krakow  
account no. 63 1050 1445 1000 0012 0085 6001



# *XXI Conference on BIOMATERIALS IN MEDICINE AND VETERINARY MEDICINE*

*13-16 October 2011  
Hotel "Perła Południa"  
Rytro, Poland*

**[www.biomat.agh.edu.pl](http://www.biomat.agh.edu.pl)**





## SPIS TREŚCI

POLYMERIC SCAFFOLDS WITH CONTROLLED MICROSTRUCTURE AND SURFACE CHEMISTRY: MECHANICAL AND PHYSICO-CHEMICAL CHARACTERISATION AND IN VIVO EVALUATION E. PAMUŁA, E. MENASZEK, M. ORZELSKI, P. SILMANOWICZ, M. KROK, Ł. RUMIAN, P. DOBRZYŃSKI	2
MODYFIKACJA POWŁOK DLC METODĄ IMPLANTACJI JONÓW SREBRA D. BATORY, J. GORZĘDOWSKI, Ł. KOŁODZIEJCZYK, W. SZYMAŃSKI	5
WSTĘPNA ANALIZA WŁAŚCIWOŚCI POWŁOK WĘGLOWYCH WYTWARZANYCH ZA POMOCĄ METODY MW/RF NA POWIERZCHNI PIROLITYCZNEGO WĘGLA A. KRÓL, T. KAŻMIERCZAK, W. KACZOROWSKI	13
OCENA WŁASNOŚCI FIZYCZNYCH I BIOLOGICZNYCH SAMOORGANIZUJĄCEGO SIĘ BIOMATERIAŁU OTRZYMANEGO Z CHITOZANU/ FOSFORANU WAPNIA/ALGINIANU DO ZASTOSOWAŃ STOMATOLOGICZNYCH M. KUCHARSKA, G. BUBAK, M. KOWALCZYK, W. BOJAR, T. BRYNK, Ł. KOPERSKI, T. CIACH	20
BIORESORBOWALNE KOPOLIMERY L-LAKTYDU I WĘGLANU TRIMETYLENU W KONTROLOWANYM UWALNIANIU PAKLITAKSLEU M. MUSIAŁ-KULIK, J. KASPERCZYK, M. PASTUSIAK, K. GĘBAROWSKA, H. JANECZEK, M. LIBERA, M. ZAJĄC	25

STRESZCZANE W *APPLIED MECHANICS REVIEWS*  
ABSTRACTED IN *APPLIED MECHANICS REVIEWS*

## CONTENTS

POLYMERIC SCAFFOLDS WITH CONTROLLED MICROSTRUCTURE AND SURFACE CHEMISTRY: MECHANICAL AND PHYSICO-CHEMICAL CHARACTERISATION AND IN VIVO EVALUATION E. PAMUŁA, E. MENASZEK, M. ORZELSKI, P. SILMANOWICZ, M. KROK, Ł. RUMIAN, P. DOBRZYŃSKI	2
MODIFICATION OF DIAMOND-LIKE CARBON COATINGS BY SILVER ION IMPLANTATION D. BATORY, J. GORZĘDOWSKI, Ł. KOŁODZIEJCZYK, W. SZYMAŃSKI	5
PROPERTIES OF CARBON COATINGS DEPOSITED ON PYROLYTIC CARBON USING MW/RF METHOD - PRELIMINARY ANALYSIS A. KRÓL, T. KAŻMIERCZAK, W. KACZOROWSKI	13
PHYSICAL AND BIOLOGICAL EVALUATION OF CHITOSAN/CALCIUM PHOSPHATE/ALGINATE SELF-SETTING BIOMATERIAL FOR DENTAL APPLICATIONS M. KUCHARSKA, G. BUBAK, M. KOWALCZYK, W. BOJAR, T. BRYNK, Ł. KOPERSKI, T. CIACH	20
BIORESORBABLE COPOLYMERS OF L-LACTIDE AND TRIMETHYLENE CARBONATE FOR CONTROLLED DELIVERY OF PACLITAXEL M. MUSIAŁ-KULIK, J. KASPERCZYK, M. PASTUSIAK, K. GĘBAROWSKA, H. JANECZEK, M. LIBERA, M. ZAJĄC	25

WYDANIE DOFINANSOWANE PRZEZ MINISTRA NAUKI  
I SZKOLNICTWA WYŻSZEGO  
EDITION FINANCED BY THE MINISTER OF SCIENCE  
AND HIGHER EDUCATION

# POLYMERIC SCAFFOLDS WITH CONTROLLED MICROSTRUCTURE AND SURFACE CHEMISTRY: MECHANICAL AND PHYSICO-CHEMICAL CHARACTERISATION AND IN VIVO EVALUATION

E. PAMUŁA<sup>1\*</sup>, E. MENASZEK<sup>1,2</sup>, M. ORZELSKI<sup>3</sup>, P. SILMANOWICZ<sup>3</sup>, M. KROK<sup>1</sup>, Ł. RUMIAN<sup>1</sup>, P. DOBRZYŃSKI<sup>4</sup>

<sup>1</sup>AGH UNIVERSITY OF SCIENCE AND TECHNOLOGY, FACULTY OF MATERIALS SCIENCE AND CERAMICS, DEPARTMENT OF BIOMATERIALS, AL. MICKIEWICZA 30, 30-059 KRAKOW, POLAND

<sup>2</sup>JAGIELLONIAN UNIVERSITY, COLLEGIUM MEDICUM, DEPARTMENT OF CYTOBIOLOGY, UL. MEDYCZNA 9, 30-688 KRAKOW, POLAND

<sup>3</sup>UNIVERSITY OF LIFE SCIENCES, FACULTY OF VETERINARY MEDICINE, DEPARTMENT AND CLINIC OF ANIMAL SURGERY, UL. GŁĘBOKA 30, 20-612 LUBLIN, POLAND

<sup>4</sup>POLISH ACADEMY OF SCIENCES, CENTER OF POLYMER AND CARBON MATERIALS, UL. M. CURIE-SKŁODOWSKIEJ 34, 41-819 ZABRZE, POLAND

\* E-MAIL: EPAMULA@AGH.EDU.PL

*[Engineering of Biomaterials, 105, (2011), 2-4]*

## Introduction

Scaffolds made of resorbable polymers, for example copolymers of lactide and glycolide (PLGA), are very promising biomaterials for bone and cartilage tissue engineering and regeneration [1]. It was found that they provide temporary matrix enhancing cells adhesion, proliferation and their osteogenic/chondrogenic differentiation [2,3]. Our previous experiments showed that the scaffolds produced from PLGA support growth and differentiation of osteogenic cells in vitro [4,5]. Interestingly, the scaffolds with bigger pores (400-600 µm) were found to be the most appropriate for cell adhesion, proliferation and differentiation in vitro [5]. We attributed it to higher pore interconnectivity and scaffold permeability, thus assuring better diffusion of nutrients, wastes and/or material degradation products in the whole volume of the scaffold [5]. Moreover, we have shown that the PLGA scaffolds can be modified with hydroxyapatite (HAp), the most abundant mineral phase in natural bone, which assured better conditions to adhering cells and promoted their osteogenic differentiation [6].

The aim of this study was to analyze tissue healing in critical-size osteochondral defects treated with different PLGA scaffolds in a rabbit model. Particularly we wanted to explore the influence of pore size and presence of HAp in the PLGA scaffolds on bone and cartilage tissue healing in a short-term study.

## Materials and Methods

### Scaffolds manufacturing

PLGA 85:15 ( $M_n=100$  kDa,  $d=2.1$ ) was synthesized according to the method described previously [7]. Two types of cylindrical porous scaffolds (diameter 4 mm, height 5 mm) with porosity of 85% and size of the pores of 250-320 µm and 400-600 µm respectively, were obtained by a newly modified solvent casting/salt particulate leaching method [5].

The scaffolds were also modified with HAp by biomimetic SBF method [6].

### Scaffolds characterization

The microstructure of PLGA and PLGA/HAP scaffolds was studied with the use of a scanning electron microscope (JEOL 5400) under magnifications of 50x and 2000x. Before the analysis, the samples were sputter-coated with a thin carbon layer to make them conductive. Elemental composition of the scaffolds was studied by energy dispersive X-ray (EDX) spectroscopy (Link AN 10000, UK).

The water contact angle was evaluated by drop shape analysis system (DSA 10 Mk2, Kruss) equipped with a digital camera. UHQ-water droplets of 2 µl were put on the surface of the scaffolds and immediately the picture of the droplet was taken with a digital camera. The results are presented as the average  $\pm$  SD (Standard Deviation) for six individual droplets placed on each type of the scaffolds.

The mechanical properties of the scaffolds were evaluated using a compression test on the universal testing machine ZWICK 1435. The cross-head speed was set at 1 mm/min. Stress-strain curves were collected from load and displacement measurements. The compressive modulus was defined as the initial linear modulus and the compressive strength at 60% strain was recorded. The results are presented as the average  $\pm$  SD for six individual scaffolds originating from each experimental group.

### In vivo experiment

The scaffolds after sterilization with oxygen peroxide plasma (Sterrad 120, ASP, J&J) were implanted into experimentally created critical-size osteochondral defects in the New Zealand rabbit femoral trochlea. The research protocol for the in vivo study was approved by the local ethic committee. Four animals were used and each animal received three implants. The fourth defect was left empty. After 4 weeks from the surgery the animals were euthanatized, the femora containing implants were excised, placed in formalin, decalcified in buffered EDTA and embedded in Paraplast. Histological slices of 9 µm in thickness were prepared and stained by Masson-Goldner method.

## Results and Discussion

### Properties of the scaffolds

FIG. 1 shows the microstructure of the scaffolds registered by scanning electron microscope. The scaffolds have interconnected pores of a size close to the size of porogen particles used in the process of their preparation. Under higher magnifications, i.e. 2000x, round cauliflower-shape deposits on the pore walls are visible on the scaffolds submitted to incubation in SBF (FIG. 1C, inserts). The deposits were observed both on the surface of the scaffolds as well in the cross sections. EDX spectroscopy analysis confirmed that on PLGA scaffolds after contact with SBF calcium and phosphorus were detected (FIG. 1F, TABLE 1). The Ca/P ratio was 1.6, which is similar to that of hydroxyapatite. The SEM and EDX results obtained in this study were similar to those presented on our previous paper [5].

The results of wettability show that the water contact angle on raw PLGA scaffolds is relatively high, and does not depend on the pore size (TABLE 1). On the contrary, on the scaffolds with hydroxyapatite deposits, the water droplets immediately penetrated the scaffolds, thus making impossible registration of the shape of the droplets. It means that presence of HAp on the pore walls decreased hydrophobicity of the material, thus improving water penetration within the volume of the scaffolds.

**TABLE 1. Chemical composition by EDX, water contact angle, strength and modulus of PLGA scaffolds.**

	Chemical composition [at%]				Water contact angle	Strength $\sigma$	Modulus E
	C	O	Ca	P	[degree]	[MPa]	[MPa]
250-320 $\mu\text{m}$	61	39	nd	nd	$126.7 \pm 9.3$	$0.58 \pm 0.10$	$0.63 \pm 0.12$
250-320 $\mu\text{m}$ /HAP	17	66	10.6	6.4	nd	$1.14 \pm 0.31$	$1.72 \pm 0.37$
400-600 $\mu\text{m}$	58	42	nd	nd	$120.4 \pm 6.8$	$0.60 \pm 0.09$	$0.68 \pm 0.15$

nd – not detectable

TABLE 1 presents the results of compression test of the scaffolds. The results of modulus tended to be higher than those obtained in our previous experiment [5], but the differences were not statistically significant. The compressive strength and modulus of the scaffolds measured at 60% strain were significantly higher for the scaffolds with HAp. Size of pores did not influence both compressive strength and modulus.

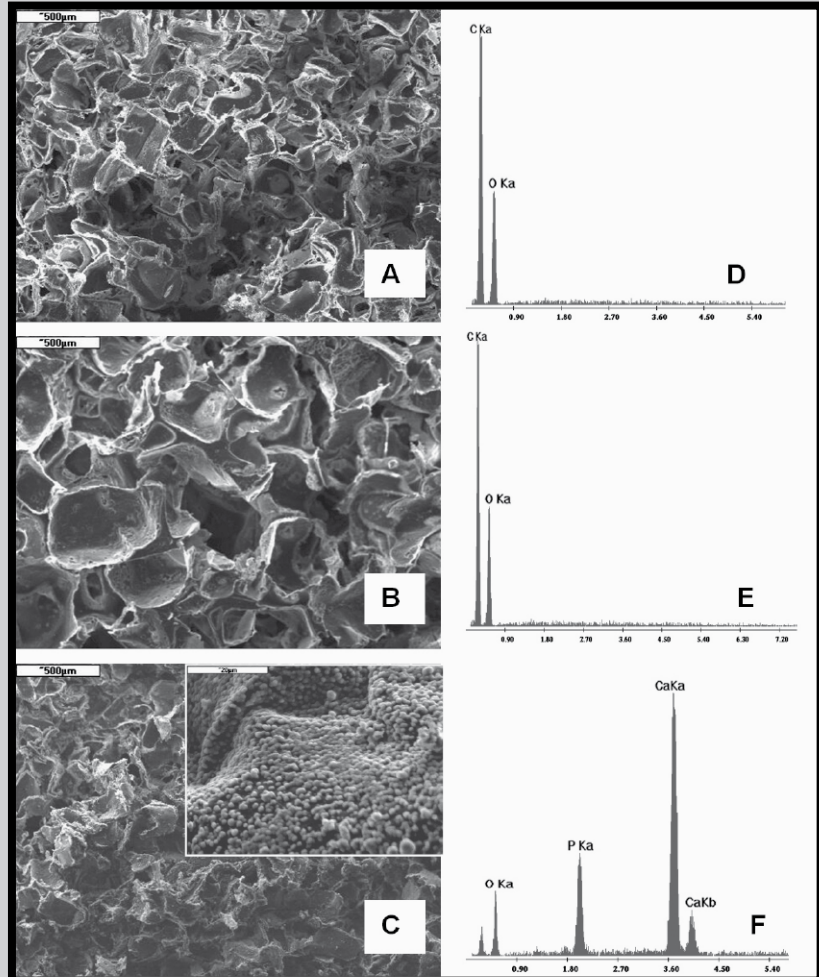
### In vivo evaluation

FIG. 2 shows macroscopic appearance of tissue defects treated with three different types of scaffolds and that of empty defect. The images show that tissue healing was more advanced in the defects filled with the scaffolds having the pore size of 250-320  $\mu\text{m}$  and those enriched with HAp (FIG. 2A). On the other hand, healing process was inhibited in the defects filled with the scaffolds with bigger pores, e.g. 400-600  $\mu\text{m}$  in diameter, and in the case of empty defect (FIG. 2B).

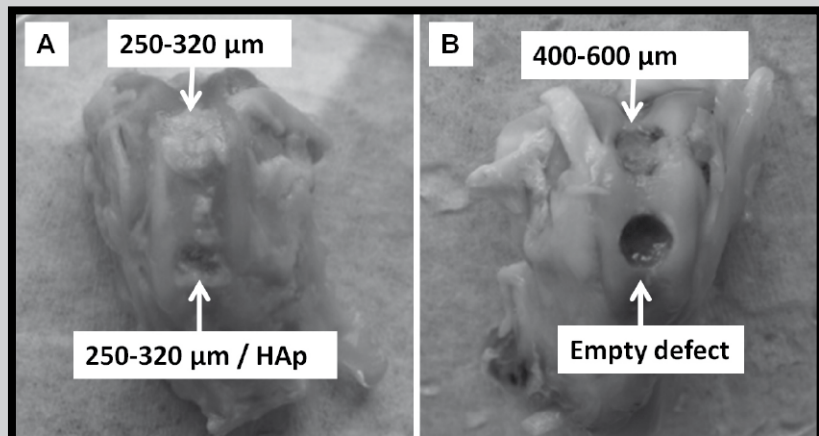
Histological pictures after Masson-Goldner staining of all examined materials and that of empty defect are presented in FIG. 3. The results show that on the base of the implanted scaffolds with the pores of 250-320  $\mu\text{m}$  (FIG. 3A) and of 250-320  $\mu\text{m}$  enriched with HAp (FIG. 3B) newly formed bone trabeculae were observed. Bone regeneration was more advanced in the case of the scaffolds enriched with HAp (FIG. 3B). Newly-formed hyaline cartilage was also visible in those samples (FIG. 3A, B).

On the contrary, in the case of the scaffolds with bigger pores, i.e. 400-600  $\mu\text{m}$  in diameter (FIG. 3C), only some remnants of the scaffold material and connective tissue were present. It was presumably due to the fact that histological procedure (consisting of several staining, washing and drying steps) was hazardous for fine and delicate newly-formed tissue. This is an indirect proof that bone/cartilage tissue healing for this defect was inhibited in comparison with the defects treated with scaffolds with small pores. In the case of empty defect bone/cartilage tissue healing was least advanced (FIG. 3D).

The results of this study show that in osteochondral rabbit model in a short-term period the scaffolds with smaller pores better supported tissue healing than those with bigger pores. It is contradictory to our previous findings received from in vitro studies of osteoblast-like cells in both static and dynamic conditions, in which bigger pores (400-600  $\mu\text{m}$ ) were the most appropriate for cell adhesion, proliferation and differentiation of osteogenic and mesenchymal stem cells [3,8].

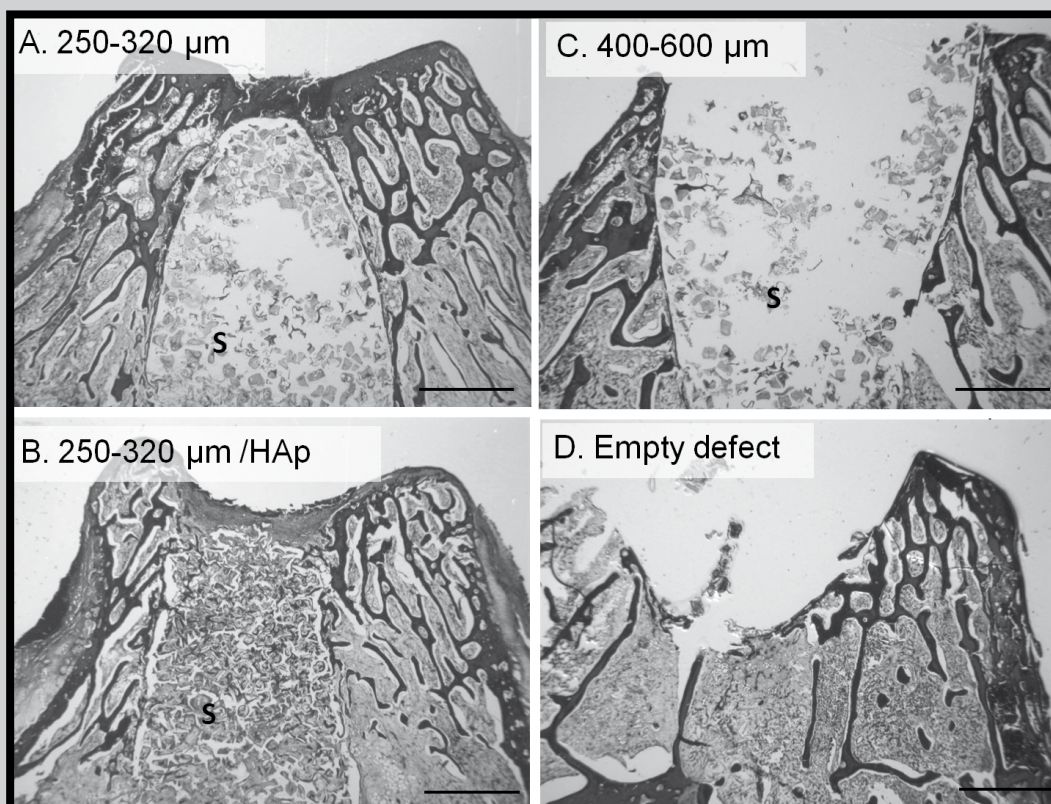


**FIG. 1. SEM microphotographs (A, B, C) and EDX spectra (D, E, F) of PLGA scaffolds with pore size of 250-320  $\mu\text{m}$  (A, D), 400-600  $\mu\text{m}$  (B, E), and 250-320  $\mu\text{m}$  with HAP deposits (C, F).**



**FIG. 2. Macroscopic appearance of tissue defects in rabbit femoral trochlea (A – left leg, B – right leg) after 4 weeks from surgery treated with scaffolds with size of pores: 250-320  $\mu\text{m}$ , 250-320  $\mu\text{m}$  and HAp, 400-600  $\mu\text{m}$ , and empty defect.**





**FIG. 3.** Histological pictures of tissue defects in rabbit femoral trochlea after 4 weeks from surgery treated with scaffolds: A – poresize 250-320  $\mu\text{m}$ , B – poresize 250-320  $\mu\text{m}$  and HAp, C – poresize 400-600  $\mu\text{m}$ , and D – empty defect; Masson-Goldner staining, s – scaffold, optical microscope Zeiss StereoDiscovery, original magnification 20x, bar = 2 mm.

Probably relative surface area of the scaffolds, which was higher for the scaffolds with smaller pores than for those with bigger pores, better enhanced osteogenic cells migration from the periphery into the centre of the bone defect. As a result tissue healing and regeneration proceeded faster. Interestingly, the results of this study correlate well with the results of the experiment conducted in the soft tissue model in rats, in which three types of scaffolds of defined pore-size (about 200, 400 and 600  $\mu\text{m}$ ) were applied [9]. It was found that cell penetration, extent of inflammation, and tissue regeneration were inversely proportional to the size of pores in the scaffolds, being the most advanced in the scaffolds with smaller pores [9].

## Conclusions

In summary, the results show that it is feasible to produce PLGA scaffolds with defined microstructure, surface characteristics and mechanical properties. The PLGA scaffolds with pores in the range of 250-320  $\mu\text{m}$  containing HAp deposits have the highest potential for critical-size osteochondral defects healing in a short-term study.

## Acknowledgements

*This study was financed from the Polish Budget Funds for Scientific Research within the years 2009-2012, as a research project N° N507280736.*

## References

- [1] Seyednejad H., Ghassemi A. H., van Nostrum C. F., Vermonden T., Hennink W. E.: Functional aliphatic polyesters for biomedical and pharmaceutical applications. *J. Control Release.* 2011 May 30; 152(1):168-76.
- [2] Kruger E. A., Im D.D., Bischoff D.S., Pereira C.T., Huang W., Rudkin G.H., Yamaguchi D.T., Miller T.A.: In vitro mineralization of human mesenchymal stem cells on three-dimensional type I collagen versus PLGA scaffolds: a comparative analysis. *Plast. Reconstr. Surg.* 2011 Jun;127(6):2301-11.
- [3] Park K., Cho K. J., Kim J. J., Kim I. H., Han D. K.: Functional PLGA scaffolds for chondrogenesis of bone-marrow-derived mesenchymal stem cells. *Macromol. Biosci.* 2009 Mar 10;9(3):221-9.
- [4] Pamula E., Bacakova L., Filova E., Buczynska J., Dobrzynski P., Noskova L., Grausova L.: The influence of pore size on colonization of poly(L-lactide-glycolide) scaffolds with human osteoblast-like MG 63 cells in vitro. *J. Mater. Sci. Mater. Med.* 2008 Jan;19(1):425-35.
- [5] Pamula E., Filová E., Bacáková L., Lisá V., Adamczyk D.: Resorbable polymeric scaffolds for bone tissue engineering: the influence of their microstructure on the growth of human osteoblast-like MG 63 cells. *J. Biomed. Mater. Res. A.* 2009 May;89(2):432-43.
- [6] Douglas T., Pamula E., Hauk D., Wiltfang J., Sivananthan S., Sherry E., Warnke P.H.: Porous polymer/hydroxyapatite scaffolds: characterization and biocompatibility investigations. *J. Mater. Sci. Mater. Med.* 2009 Sep;20(9):1909-15.
- [7] Dobrzyński P., Kasperczyk J., Janeczek H., Bero M.: Synthesis of biodegradable copolymers with the use of low toxic zirconium compounds. 1. Copolymerization of glycolide with L-lactide initiated by Zr(acac). *Macromolecules* 2001; 34: 5090-5098.
- [8] Wojak I., Pamula E., Dobrzyński P., Zimmermann H., Worch H., Scharnweber D., Hintze V.: Coating of poly(L-lactide-co-glycolide) scaffolds with collagen/glycosaminoglycan matrices and their effects on osteoblast behavior. *Eng. Biomater.* 2009; 86: 9-13.
- [9] Menaszek E., Pamula E.: The soft tissue response to different forms of PLGA implants. 7<sup>th</sup> Advanced Summer Course in Cell-Materials Interactions, June 19-23, 2006, Porto, Portugal.

# MODYFIKACJA POWŁOK DLC METODĄ IMPLANTACJI JONÓW SREBRA

DAMIAN BATORY\*, JEREMIASZ GORZĘDOWSKI,  
ŁUKASZ KOŁODZIEJCZYK, WITOLD SZYMAŃSKI

POLITECHNIKA ŁÓDZKA, INSTYTUT INŻYNIERII MATERIAŁOWEJ  
UL. STEFANOWSKIEGO 1/15, 90-924 ŁÓDŹ  
\* E-MAIL: DAMIAN.BATORY@GMAIL.COM

## Streszczenie

*Współcześnie wraz z rozwojem medycyny, w szczególności technik operacyjnych i zabiegów, następuje bardzo szybki postęp w dziedzinie biomateriałów. W dalszym ciągu istnieje potrzeba poszukiwania nowych materiałów o kontrolowanej biokompatybilności i określonych właściwościach użytkowych, które mogą poprawić komfort życia oraz przyspieszyć proces leczenia pacjentów cierpiących m.in. na różnego rodzaju alergię. Nowoczesne technologie inżynierii powierzchni pozwalają na tworzenie nowych oraz modyfikowanie już istniejących typów powłok, polepszając tym samym ich właściwości użytkowe oraz niejednokrotnie nadając nowe cechy, jak choćby właściwości antybakteryjne. Przykładem takiego materiału mogą być domieszkowane srebrem nanokompozytowe powłoki amorficznego węgla wytworzone na powierzchni stali AISI316LVM.*

*Diamentopodobne powłoki węglowe wytworzono hybrydową metodą RF PACVD/MS (Radio Frequency Plasma Assisted Chemical Vapor Deposition / Magnetron Sputtering). Powłoki następnie domieszkowano jonami srebra metodą implantacji jonów. Tak otrzymane podłoża badano pod kątem składu chemicznego, morfologii i topografii powierzchni, kąta zwilżania oraz właściwości mechanicznych. Wyniki przeprowadzonych badań wskazują na znaczną poprawę wartości parametru H/E bez zmiany wyjściowej twardości powłoki węglowej oraz zmianę udziału składowej polarnej i dyspersyjnej swobodnej energii powierzchniowej przy zachowaniu hydrofilowych właściwości powłoki.*

**Słowa kluczowe:** diamentopodobny węgiel, implantacja jonów, srebro, AISI 316LVM

[Inżynieria Biomateriałów, 105, (2011), 5-12]

## Wprowadzenie

Starzenie się społeczeństwa, pozostawanie w pracy w pozycji siedzącej przez 6-8 godzin dziennie, a także brak wolnego czasu na zajęcia ruchowe, powoduje wzrost występowania wielu schorzeń układu mięśniowo-szkieletowego, co wpływa na gwałtowny rozwój rynku biomateriałów w ciągu ostatnich lat. Ponadto, tendencja ta ma wzrosnąć w przyszłości - przewiduje się, że wartość rynku europejskiego zaopatrzenia służącego do zewnętrznej i wewnętrznej stabilizacji złamań kości do roku 2016 osiągnie wartość prawie 600 mln euro [1]. Dlatego istnieje wyraźna potrzeba opracowywania nowych materiałów o kontrolowanej biokompatybilności, dobrych parametrach użytkowych, często będących wynikiem dodatkowej modyfikacji już istniejącego materiału.

# MODIFICATION OF DIAMOND-LIKE CARBON COATINGS BY SILVER ION IMPLANTATION

DAMIAN BATORY\*, JEREMIASZ GORZĘDOWSKI,  
ŁUKASZ KOŁODZIEJCZYK, WITOLD SZYMAŃSKI

TECHNICAL UNIVERSITY OF ŁÓDŹ,  
INSTITUTE OF MATERIALS SCIENCE AND ENGINEERING,  
1/15 STEFANOWSKIEGO ST. 90-924 ŁÓDŹ, POLAND  
\* E-MAIL: DAMIAN.BATORY@GMAIL.COM

## Abstract

*Nowadays, the advances in medicine, in particular, surgical techniques, are followed by very vast growth of the biomaterials market. Thus, there is a tangible need for development of new materials with controlled bioactivity and certain useful properties that can improve the quality of life and the healing processes of patients suffering from various types of allergies. Modern technologies in surface engineering allow creation of new and modification of existing types of coatings, thereby improving their performance and often adding extra features, such as antibacterial properties. An example of such material may be nanocomposite silver doped carbon coating deposited on AISI 316LVM steel.*

*Diamond-like carbon coatings were prepared by hybrid RF PACVD/MS (Radio Frequency Plasma Assisted Chemical Vapour Deposition / Magnetron Sputtering) deposition technique. Synthesized layers were subsequently doped with silver ions by means of the ion implantation method. Modified substrates were characterized in terms of chemical composition, morphology and surface topography, contact angle and mechanical properties. Results of this study show high value of H/E ratio for carbon and silver doped coatings and the evolution of the polar and dispersive component of surface free energy, while maintaining the hydrophilic properties of the coating.*

**Keywords:** diamond-like carbon, ion implantation, silver, AISI 316LVM

[Engineering of Biomaterials, 105, (2011), 5-12]

## Introduction

A rapidly ageing society, sedentary lifestyle for 6-8 hours a day and the lack of free time for physical activities result in the increasing occurrence of musculoskeletal disorders which are the main reasons for the vast growth of the orthopaedic market in recent years. Moreover, this trend is expected to increase in the future - it is predicted that the European market for internal and external bone fixation devices will be reaching a value of nearly 600 million euro by 2016 [1]. Therefore, there is a tangible need for development of new materials with controlled biocompatibility, good performance characteristics, often resulting from the additional modification of an existing material.



Stal austenityczna AISI 316LVM jest stopem dopuszczonym do celów medycznych, który znajduje bardzo szerokie zastosowanie: od narzędzi medycznych po krótkoterminowe protezy. Pomimo faktu, że istnieją inne materiały, charakteryzujące się lepszymi właściwościami mechanicznymi oraz wyższą biokompatybilnością, materiał ten jest stale wykorzystywany ze względu na konkurencyjną cenę. W związku z tym istnieje konieczność opracowywania nowych, ekonomicznie uzasadnionych technologii modyfikacji stali medycznej w celu poprawy właściwości mechanicznych i korozyjnych [2,3].

Jedną z możliwości poprawy właściwości biologicznych oraz fizykochemicznych materiałów stosowanych w medycynie jest synteza na ich powierzchni powłok o określonych parametrach użytkowych. Odpowiednim materiałem do tego typu zastosowań są warstwy DLC (diamond-like carbon) oraz NCD (Nanocrystalline diamond). Charakteryzują je m.in. wysoka biogodność, odporność na korozję, bardzo dobre właściwości mechaniczne i trybologiczne [4-6]. Warstwy węglowe są odporne na kolonizację bakterii, a także stanowią znakomitą barierę dla jonów metali uczulających [7,8]. Biorąc pod uwagę ochronny charakter powłok węglowych (ochrona przed zużyciem czy kolonizacją bakteryjną) parametrami krytycznymi w tego rodzaju aplikacji wydają się być grubość, adhezja oraz właściwości antybakteryjne. Z wcześniejszych prac zespołu wynika, że grube, gradientowe powłoki na bazie tytanu i węgla a-C:H/Ti znacząco poprawiają właściwości mechaniczne i trybologiczne stopów CoCr i NiCr oraz gęsto usieciowanego polietylenu UHMWPE [9,10]. Te same powłoki spowodowały znaczący wzrost parametrów korozyjnych stali REX 734, gdzie wartość potencjału korozyjnego powłoki wzrosła wraz jej grubością, aż do 1,7  $\mu\text{m}$  [11].

Właściwości antybakteryjne powłok węglowych można uzyskać na drodze ich domieszkowania jonami srebra. Istnieje wiele dowodów na bardzo dobre właściwości biologiczne oraz antybakteryjne tego typu pokryć. Marciano ze współpracownikami otrzymał nanokompozytowe warstwy węgla domieszkowanego srebrem na drodze rozpylania nanocząstek srebra na powierzchnię implantu oraz syntezy na ich powierzchni powłoki węglowej [12]. Kwok wraz ze współpracownikami zaproponował syntezę domieszkowanych srebrem powłok węglowych za pomocą metody filtrowanego łuku przy wykorzystaniu współosiowej katody Ag-C [13]. Podobną technologię, opartą jednak na dwóch niezależnie pracujących źródłach jonów, zaproponował zespół Czekana [14]. Z kolei zespół Zhanga otrzymał nanokompozytowe warstwy Ag-C za pomocą metody implantowania plazmowego [15]. W większości przypadków autorzy prac nie zanotowali pogorszenia się parametrów mechanicznych powłok. Wręcz przeciwnie, zauważono znaczny spadek naprężeń resztkowych przy nieznacznie obniżonej twardości powłoki [12,15,16]. Nie mniej jednak autorzy niniejszej pracy nie natrafili na publikacje dotyczące syntezy grubych powłok DLC, domieszkowanych srebrem, metodami implantacji jonów. Dlatego też wyniki przedstawione w tej pracy wydają się być nowe oraz obiecujące dla prowadzenia dalszych badań.

## Materiały i metody

### Materiał podłoża

Jako materiał podłoża zastosowano stal AISI 316LVM dostarczoną przez firmę Medgal, Polska. Materiał ten charakteryzuje się dobrymi właściwościami mechanicznymi, dobrą biogodnością oraz przystępną ceną. Niemniej jednak, jego właściwości w dalszym ciągu wymagają poprawy. Cylindryczne próbki o średnicy 12 mm i grubości 4 mm zostały przygotowane poprzez szlifowanie na papierach ściernych oraz polerowanie przy użyciu zawiesiny diamentowej za pomocą automatycznego urządzenia szlifująco-polerującego MECATECH 334 (Presi).

Stainless steel AISI 316LVM is an alloy that is approved for medical purposes and commonly used for different medical applications: from medical tools to long-term prosthesis [2]. Despite the fact that there exist some other materials that are characterized by more desired mechanical properties or higher biocompatibility, AISI 316LVM stainless steel is constantly used due to its competitive price. Therefore, there is a need to develop new technologies of modification of medical steel to improve mechanical properties and corrosion features, and to be economically justified [2,3].

One of the possibilities to improve physicochemical and biological properties of materials used in medicine is a synthesis on the surface coatings of specified parameters. Suitable materials for this type of applications are diamond-like carbon (DLC) and nanocrystalline diamond (NCD) films. They are characterized by high biocompatibility, corrosion resistance, very good mechanical and tribological properties [4-6]. Carbon layers are resistant to bacterial colonisation, and also provide an excellent diffusion barrier to the sensitizing metal ions [7,8]. Taking into consideration the protective function of carbon coatings (against wear and bacterial colonisation) the critical parameters in this type of application seem to be thickness, adhesion and antibacterial properties. Our previous examinations proved that thick gradient titanium and carbon based coatings (a-C:H/Ti) noticeably improve the mechanical and tribological properties of CoCr and NiCr alloys, as well as the ultra high molecular weight polyethylene (UHMWPE) [9,10]. Application of the same coatings resulted in a significant increase in corrosion parameters of REX 734 steel, where the value of the corrosion potential was increasing with the coating thickness up to 1.7  $\mu\text{m}$  [11].

Enhanced antibacterial properties can be obtained by doping with silver ions. There are many papers discussing good biological and antibacterial properties of this type of layers. Marciano et al. produced nanocomposite Ag-DLC films by spraying the silver nanoparticles onto the implant's surface and subsequent synthesis of DLC layer [12]. Kwok et al. have proposed a synthesis of silver-doped carbon coatings using filtered arc deposition method using Ag-C coaxial cathode [13]. Similar technology, but based on two employed independent ion sources proposed Czekan and co-workers [14]. The team of Zhang obtained nanocomposite Ag-C layers using plasma implantation method [15]. In most cases, authors have noted no deterioration in mechanical performance of the coatings. On the contrary, a significant decrease of residual stresses at a slightly lower hardness of the coatings was observed [12,15,16]. Nevertheless, the authors of this work have not found papers on the synthesis of thick DLC coatings doped with silver by means of the ion implantation method. Therefore, the results presented in this paper seem to be new and promising for further research.

## Materials and methods

### Substrate material

As the substrate material AISI 316LVM steel (Medgal, Poland) was chosen. It is characterized by good mechanical properties, fine biocompatibility and reasonable price. Nevertheless, its properties are still not perfect, thus require some improvements. Cylindrical samples of 12 mm in diameter and 4 mm thick were grinded on sandpapers and polished using diamond suspension on automatic polishing machine MECATECH 334 (Presi, France).



## Synteza powłok DLC

Diamentopodobne powłoki węglowe wytworzone zostały za pomocą hybrydowej metody RF PACVD/MS (Radio Frequency Plasma Assisted Chemical Vapour Deposition/Magnetron Sputtering). Zastosowanie gradientu składu chemicznego wraz z poprawiającą adhezję międzywarstwą Ti pozwoliło na syntezę grubej oraz dobrze przylegającej powłoki węglowej. Szczegóły procesu syntezy przedstawiono w TABELI 1. Grubość otrzymanych powłok a-C:H/Ti wynosiła ok. 700 nm, gdzie sumaryczna grubość tytanowej międzywarstwy poprawiającej adhezję oraz międzywarstwy o charakterze gradientowym Ti – C wynosiła 200 nm.

## Synthesis of DLC

DLC coatings were synthesized by means of the hybrid Radio Frequency Plasma Assisted Chemical Vapour Deposition/Magnetron Sputtering (RF PACVD/MS) method. Application of chemical composition gradient together with adhesion promoting titanium interlayer made it possible to manufacture well adherent carbon coatings. The details of the process are gathered in TABLE 1. Thickness of synthesized gradient a-C:H/Ti layers was about 700 nm, where the total thickness of adhesion promoting Ti interlayer and gradient Ti – C interlayer was about 200 nm.

**TABELA 1. Szczegóły oraz parametry procesu syntezy.**  
**TABLE 1. The details and parameters of the synthesis process.**

Etap / Phase	Trawienie w plazmie Ar Ar Plasma Etching	Impulsowe rozpylanie magnetronowe Pulsed Magnetron Sputtering	Synteza powłoki DLC DLC deposition
Szczegóły / Details	Ciśnienie / Pressure: 2 Pa Czas / Duration: 10 min $U_p = -800$ V	Ciśnienie / Pressure: 0.5 Pa Czas / Duration: 12 min $U_p = -300$ V Moc / Power: 2.2 – 2.7 kW Tytanowa katoda / Titanium target Przepływ $CH_4$ / $CH_4$ flow: 1-7 sccm	Ciśnienie / Pressure: 20 Pa Czas / Duration: 50 min $U_p = -300$ V Gas roboczy / Precursor: $CH_4$

## Domieszkowanie powłoki DLC jonami srebra

Szczegóły procesu domieszkowania przedstawione zostały w TABELI 2. Otrzymane powłoki badane były pod kątem właściwości fizykochemicznych. Skład chemiczny powłok domieszkowanych srebrem badano za pomocą elektronowego mikroskopu skaningowego FEG JSM 7600 F (JEOL) wyposażonego w spektrometr EDS INCA 250 (Oxford). Morfologia i topografia powierzchni analizowane były metodami mikroskopii optycznej oraz sił atomowych, przy wykorzystaniu mikroskopu optycznego Olympus GX 71 (Olympus) oraz mikroskopu AFM Multimode wyposażonego w kontroler Nanoscope V (Bruker) pracującego w trybie tapping. Wszystkie badania prowadzono w warunkach otoczenia. Do badań wykorzystano sądy krzemowe typu NSC15 (MicroMasch) o nominalnej częstotliwości rezonansowej 325 kHz i stałej sprężystości belki 40 N/m. Akwizycję obrazu przeprowadzono przy użyciu oprogramowania Nanoscope 7.3 a późniejszej obróbki obrazu dokonano z wykorzystaniem programu MountainsMap 5 (Digital Surf). Dla każdej próbki skanowano obszary  $10 \times 10 \mu m$ . W oparciu o obrazy topografii wyznaczono najczęściej używane parametry chropowatości (na podstawie średnich wartości z 512 profili chropowatości). Swobodną energię powierzchniową (SEP) określono na podstawie metody Owensa-Wendta [17], wykorzystującej pomiar kąta zwilżania. Pomiary kątów zwilżania przeprowadzono przy wykorzystaniu urządzenia KRUSS, metodą bezpośredniego pomiaru kąta kropli cieczy spoczywającej na badanej powierzchni. Badania przeprowadzono dla dwóch cieczy: wody dejonizowanej (przewodność właściwa:  $0,1-1 \mu S/cm$ ) oraz diiodometanu (Sigma Aldrich). Dla każdej próbki pomiar powtarzany był trzykrotnie, po czym wyniki uśredniono. Właściwości mechaniczne domieszkowanych srebrem powłok węglowych badano przy wykorzystaniu techniki nanoindentacji. Badania te wykonano z użyciem nanoindentera G200 (Agilent Technologies), który stanowi modułowy system do badań twardości, modułu sprężystości w zakresie nano, adhezji powłok metodą rysy, odporności na kruche pękanie oraz wytrzymałości zmęczeniowej.

## Doping of DLC coatings with silver

**TABELA 2. Szczegóły procesu domieszkowania.**  
**TABLE 2. The details and parameters of the doping process.**

	Implantacja jonów srebra / Silver doping
Szczegóły / Details	Energia jonów / Ions energy: 15 keV Głębokość penetracji / Penetration depth: $<0.5 \mu m$ Koncentracja jonów / Ions concentration: $4 \times 10^{16}$ jon/cm <sup>2</sup> / $4 \times 10^{16}$ ions/cm <sup>2</sup>

The details of the doping process are gathered in TABLE 2. Obtained coatings were analyzed in terms of physicochemical properties. Chemical composition of Ag-doped coatings

was determined using FEG JSM 7600 F (JEOL) scanning electron microscope equipped with INCA 250 (Oxford) EDS analyzer. Surface morphology and topography were measured using optical and atomic force microscopy, using Olympus GX 71 (Olympus, Japan) optical microscope and AFM Multimode equipped with Nanoscope V controller (Bruker Corporation, USA) working in tapping mode. All investigations were performed under ambient conditions. Commercial silicon cantilevers type NSC15 were used (MicroMasch, Estonia) with nominal resonance frequency of 325 kHz and a nominal cantilever spring constant of 40 N/m. Image acquisition was performed with use of Nanoscope 7.3 software and further image processing was done using MountainsMap 5 (Digital Surf, France) software. For each sample the area of  $10 \times 10 \mu m$  was scanned. Based on AFM topography images commonly used roughness parameters were defined (average values taken from 512 surface profiles). Surface free energy (SFE) was computed according to the Owens-Wendt [17] method that uses contact angles. Contact angles were measured with KRUSS Contact Angle Measuring Instrument, using sessile drop method. Two liquids were used: deionised water (specific conductivity:  $0.1-1 \mu S/cm$ ) and diiodomethane (Sigma Aldrich, USA). Each time a standard volume of  $0.8 \mu l$  was applied on the sample surface. The measurement was repeated three times and the results were averaged. Mechanical properties of Ag-doped coatings were measured using nanoindentation technique. Nanoindentation tests were performed using a Nano Indenter G200 system (Agilent Technologies, USA), which is a modular system for nanoindentation, nanoscratch and nanoimpact testing.

Odciski wykonano diamentowym węgelnikiem o geometrii typu Berkovich (Micro Star Technologies) stosując metodę CSM (Continuous Stiffness Measurment). Przed pomiarem wyznaczono funkcję powierzchniową dla węglownika przeprowadzając testy na próbce wzorcowej wykonanej ze szkła kwarcowego (Corning 7980). Wyniki analizowano bazując na metodzie Olivera i Pharra [18]. Dla każdej badanej powierzchni wykonano dziewięć odcisków ze stałą szybkością odkształcania  $0,05 \text{ s}^{-1}$ .

Dla porównania wszystkie badania prowadzono dodatkowo na próbkach pokrytych warstwą DLC oraz czystych podłożach AISI 316LVM.

## Wyniki i dyskusja

### Mikroskopia optyczna

Na RYS. 1 przedstawiono obrazy powierzchni: próbki pokrytej warstwą DLC oraz próbki domieszkowanej srebrem. Powierzchnia próbki domieszkowanej srebrem wykazuje bardziej złożoną morfologię w porównaniu z warstwą węglową. Powierzchnia powłoki DLC jest równomierna i jednorodna. Na powierzchni próbki domieszkowanej srebrem widoczne są równomiernie rozmieszczone plamy o zaokrąglonych kształtach i średnim rozmiarze od 8 do 15  $\mu\text{m}$ . Jednak dla pełnej analizy natury ich powstawania wymagane jest przeprowadzenie dodatkowych badań.

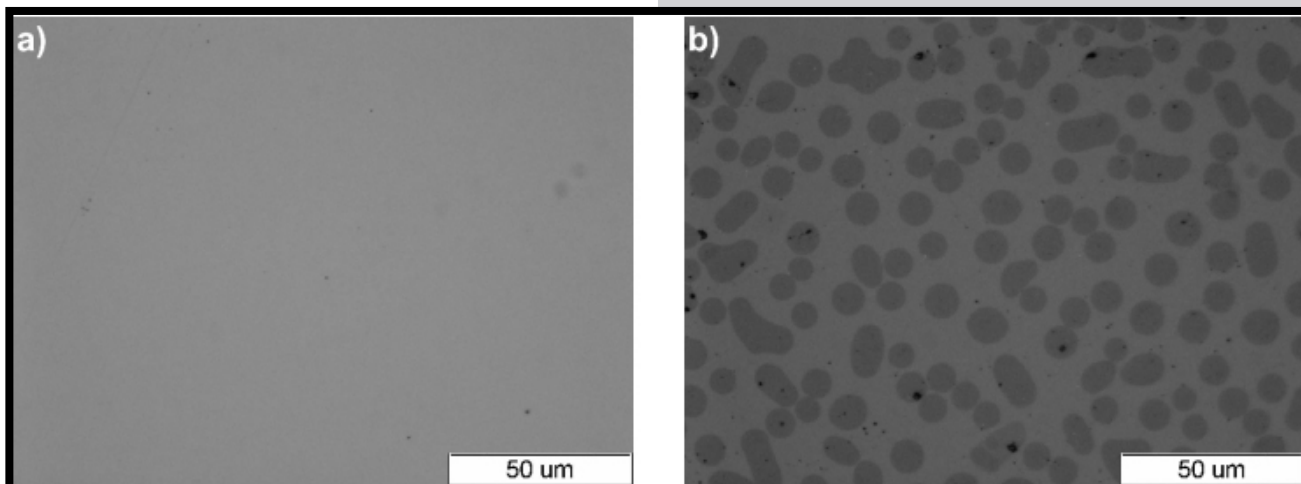
For nanoindentation with a diamond Berkovich tip (Micro Star Technologies, USA), the continuous stiffness measurement (CSM) mode was used, and the tip shape was calibrated by conducting experiments on a fused silica standard (Corning 7980). The data were analyzed using the Oliver and Pharr [18] approach and nine repeated loading-partial unloading experiments were performed on each sample. The tests have been carried out at a strain rate of  $0.05 \text{ s}^{-1}$ .

For each examination DLC coated and pure AISI 316LVM substrates were added for comparison.

## Results and discussions

### Optical microscopy

FIG. 1 shows the DLC coated sample surfaces with and without silver doping. Ag-doped sample shows more complex morphology than raw DLC coating. Surface of DLC layer is uniform and homogeneous. On the surface of Ag-doped sample individual spots are distinguishable, with rounded shape and averaged size from 8 to 15  $\mu\text{m}$ . However for full analysis of the origin of spots appearance additional examinations are needed. There are visibly more defects on Ag-doped surface, which are probably caused by the ion implantation process.



RYS. 1. Obraz z mikroskopu optycznego powierzchni próbek: (a) AISI 316LVM z wytworzoną powłoką DLC, (b) AISI 316LVM z domieszkowaną srebrem powłoką DLC.

FIG. 1. Optical microscope images of sample surfaces: (a) AISI 316LVM coated with DLC, (b) AISI 316LVM coated with DLC, Ag-doped.

### Skaningowa mikroskopia elektronowa

W TABELI 3 przedstawiono wyniki analizy składu chemicznego. Atomowa koncentracja srebra w powłoce węglowej wynosi ok. 0,4 %, co odpowiada wynikom wstępnych obliczeń, przeprowadzonych na potrzeby procesu implantacji jonów srebra.

### Scanning electron microscopy

TABLE 3 presents the results of the chemical composition examination. The atomic concentration of silver after the implantation process is equal to about 0.4 % which is in agreement with the preliminary calculations conducted for the ion implantation process.

TABELA 3. Wyniki analizy składu chemicznego.

TABLE 3. Results of the chemical composition analysis.

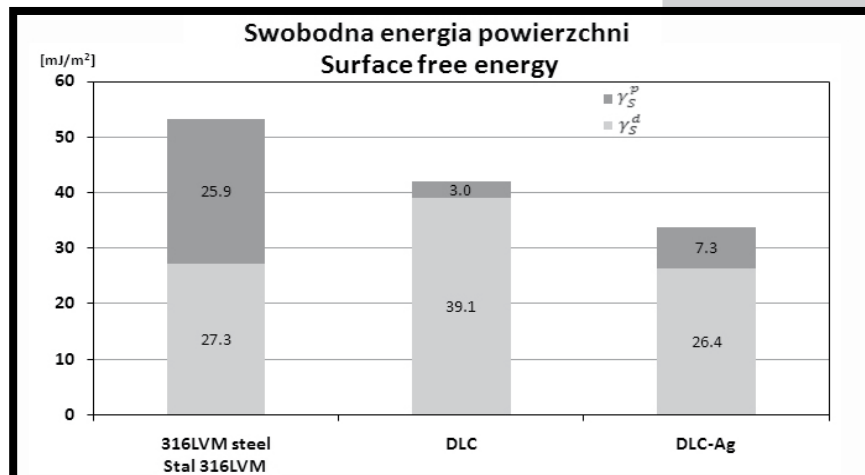
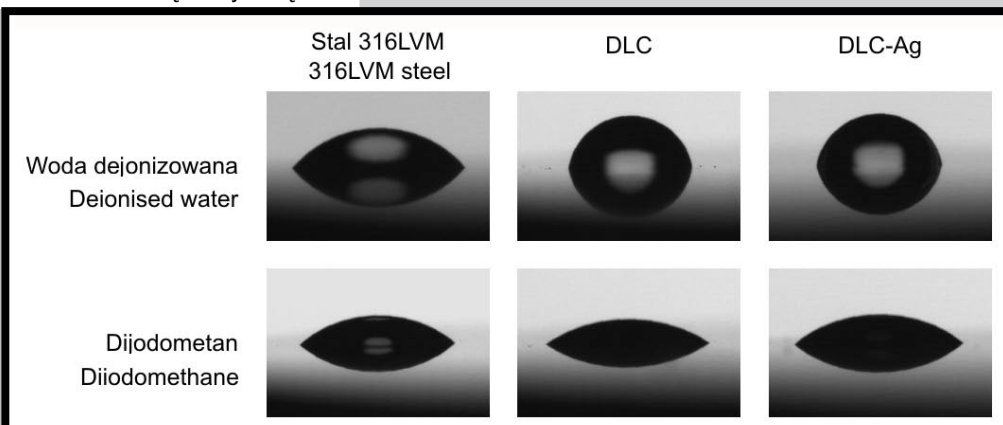
Pierwiastek Element	% wag. Weight%	% at. Atomic%
C K	84.32	95.40
O K	1.21	1.03
Ti K	11.12	3.15
Ag L	3.35	0.42

### Swobodna energia powierzchniowa (SEP)

Na RYS. 2 pokazano zachowanie się kropli polarnych i niepolarnych cieczy na powierzchniach badanych próbek. Wykres słupkowy (RYS. 3) przedstawia wartości SEP dla stali AISI 316LVM, stali AISI 316LVM modyfikowanej warstwą węglową oraz tej samej próbki domieszkowanej srebrem. Łączne wartości swobodnych energii powierzchniowych dla stali medycznej, powłoki DLC oraz powłoki DLC domieszkowanej srebrem wynoszą odpowiednio 53,2 mJ/m<sup>2</sup>, 42,1 mJ/m<sup>2</sup> oraz 33,7 mJ/m<sup>2</sup>. Stal AISI 316LVM charakteryzuje się nieznacznie wyższą wartością składowej dyspersyjnej w porównaniu ze składową polarną SEP, podczas gdy w przypadku powłok DLC oraz DLC domieszkowanej srebrem, składowa dyspersyjna stanowi odpowiednio ponad 92% oraz 78% całości SEP. Wszystkie badane powierzchnie wykazują właściwości hydrofilowe. Spośród nich najniższą wartością kąta zwilżania dla wody charakteryzuje się stal medyczna. Ponadto udział składowej polarnej SEP powłoki DLC domieszkowanej srebrem jest nieznacznie wyższy w porównaniu do niemodyfikowanej powłoki DLC. Wnioski te potwierdzają obrazy przedstawione na RYS. 2. Powłoka DLC domieszkowana srebrem wykazuje wyraźnie mniej hydrofilowy charakter w porównaniu ze stalą medyczną.

**RYS. 2. Obrazy kropli wody dejonizowanej oraz diiodometanu na trzech rodzajach powierzchni.**

**FIG. 2. Images of deionised water and diiodomethane drops on three types of surfaces.**



**RYS. 3. Swobodna energia powierzchniowa wszystkich typów próbek: ciemny słupek odpowiada składowej polarnej, natomiast jasny słupek odpowiada składowej dyspersyjnej.**

**FIG. 3. Surface free energies of each type of sample: the dark bar represents polar component, and the bright bar represents dispersion component.**

### Twardość i moduł sprężystości wzdłużnej

Wyniki pomiarów twardości oraz modułu sprężystości przedstawiono na RYS. 4 oraz w TABELI 4. Powłoki DLC wykazują wzrost twardości o około 3,5 razy w stosunku do stalowego podłoża. Proces implantacji jonów srebra nie wpływa znacząco na twardość powłoki. Rozrzut wyników twardości pozostaje w granicy błędów pomiaru, dlatego też można założyć, że implantacja jonów srebra o danej koncentracji nie wpływa na twardość powłoki DLC. Podobnie, nie ma jednoznacznych dowodów na wpływ procesu domieszkowania na wartość modułu sprężystości powłoki DLC. Jednak w porównaniu z materiałem wyjściowym można zaobserwować wyraźny jego spadek dla próbek pokrytych warstwą węglową.

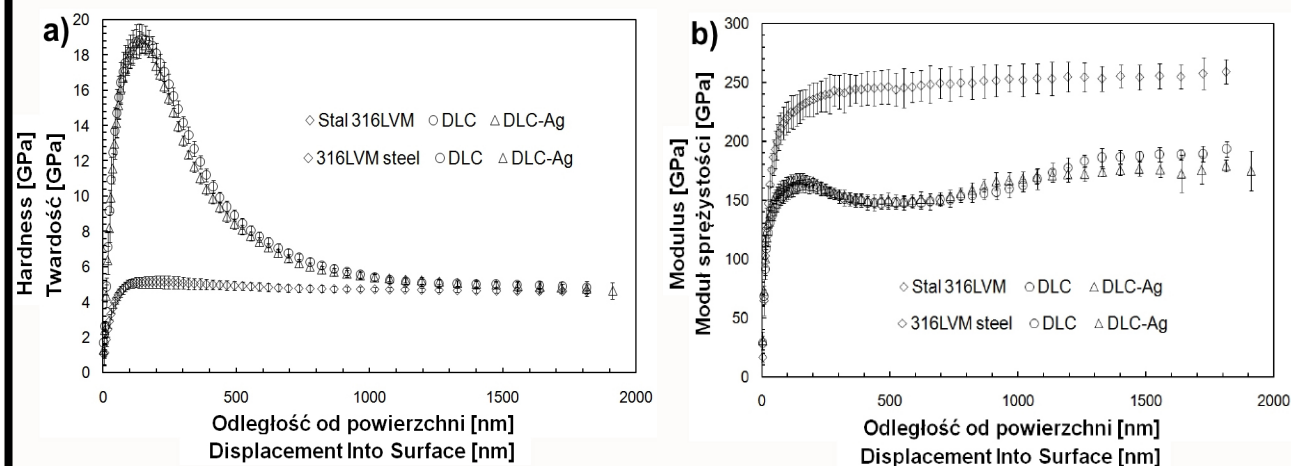
### Surface free energy (SFE)

FIG. 2 shows the behaviour of polar and non-polar liquid drops on the samples surfaces. The bar chart (FIG. 3) shows the values of SFE of AISI 316LVM steel, AISI 316LVM steel coated with DLC, and the same sample doped with silver. The total value of surface free energies for stainless steel, DLC coating and for Ag-doped DLC coating, are equal to 53.2, 42.1 and 33.7 mJ/m<sup>2</sup>, respectively. AISI 316LVM is characterized by slightly higher dispersion than polar components of SFE, while in the case of DLC coating and Ag-doped DLC coating, dispersive components represent more than 92% and 78% of total SFE, respectively. All the sample surfaces are hydrophilic. Amongst them the lowest water contact angle presents stainless steel. What is more, the fraction of polar component in SFE of Ag-doped surface is slightly higher in comparison to DLC coating. These conclusions are confirmed by images in FIG. 2 - apparently the surface of Ag-doped DLC coating is greatly less hydrophilic than the surface of stainless steel.

### Hardness and modulus

Hardness and modulus measurements results are gathered in FIG. 4 and TABLE 4. Coating with DLC shows increase in hardness for about 3.5 times as compared to the bare steel substrate. Ag-doping does not influence the hardness of the coating significantly. The scatter of the hardness values remains within measurement error, thus we can assume that implantation of silver ions of such concentration does not affect the hardness of DLC layer. Similarly, there is no clear evidence of the influence of Ag doping on the modulus of DLC coating. Although a significant decrease in modulus of coated samples in comparison to bare substrate is visible.





RYS. 4. Profile a) twardości oraz b) modułu sprężystości badanych powierzchni.  
FIG. 4. Hardness a) and modulus b) depth profiles for measured samples.

TABELA 4. Wartości twardości oraz modułu sprężystości badanych powierzchni.  
TABLE 4. Values of hardness, modulus and H/E ratio for measured surfaces.

Próbka / Sample	H	Odch. Stand. / SD	E	Odch. Stand. / SD	H/E
	[GPa]				-
AISI316LVM / Stainless steel	4.65	0.12	254.48	11.16	0.02
DLC / DLC coating	18.90	0.83	161.92	5.33	0.12
DLC - Ag / Ag-doped DLC coating	18.69	0.57	168.26	4.81	0.11

#### Indeks H/E

Nie istnieje prosta zależność pomiędzy właściwościami trybologicznymi powłoki (np. odporność na zużycie) a twardością czy modułem sprężystości wzdłużnej rozpatrywanymi osobno. Właściwości te jednak są silnie uzależnione od wartości parametru wyrażonego stosunkiem H/E. Znaczenie współczynnika H/E w celu ustalenia zdolności powłoki do przeniesienia obciążeń omówione zostało w pracy Leylanda i Matthews [19]. Uzyskanie wysokiej wartości parametru H/E, tj. wystarczająco wysokiej twardości w połączeniu z niskim modułem sprężystości, skutkuje uzyskaniem powłok o najwyższej wytrzymałości. Badania Musil i współpracowników dowiodły, że kompozytowe nanopowłoki o podobnych twardościach ale różnych składach chemicznych wykazują zróżnicowane wartości modułu sprężystości [20]. Pozwala to na dostosowanie właściwości mechanicznych materiału powłoki do danych aplikacji.

Wyniki pomiarów właściwości mechanicznych wykazały znaczące różnice w wartościach parametru H/E pomiędzy niemodyfikowanymi podłożami oraz obydwojema typami powłok. W przypadku podłoży stalowych stosunek H/E jest o jeden rząd wielkości niższy w porównaniu z powłokami węglowymi oraz domieszkowanymi srebrem i wynosi odpowiednio: 0,02; 0,12 oraz 0,11 (TABELA 4). Nawiązując do wyników przedstawionych w cytowanych wyżej publikacjach można przypuszczać, że właściwości trybologiczne (odporność na zużycie) powłok na bazie węgla i srebra są znacznie bardziej korzystne w porównaniu z niemodyfikowanymi podłożami stalowymi. Jednak udowodnienie tych przypuszczeń wymaga przeprowadzenia bardziej zaawansowanych badań trybologicznych. Ponadto stosowanie różnych stężeń jonów srebra implantowanych do amorficznej osnowy węglowej, może stanowić użyteczne narzędzie pozwalające na optymalizację procesów zużycia warstw w aplikacjach medycznych (np. stabilizacja gwoździ śródstypikowych).

#### H/E ratio

There is no simple relation between the tribological properties (like wear resistance) of the coating and H or E alone. Albeit, these properties are strongly dependent on the H/E ratio. The importance of the H/E ration in determining the endurance capability of a surface coating, especially its ability to accommodate substrate deflections under load was discussed by Leyland and Matthews [19]. Generating a large H/E value, i.e. sufficiently high hardness coupled with low elastic modulus results in most durable coatings achievement.

Musil et al. [20] have revealed that nano-composite coatings with similar hardness but different chemical compositions exhibit different values of effective Young's modulus E. This permits to tailor mechanical properties of a coating material for a given application.

Results of mechanical properties measurement revealed significant differences in H/E ratios between bare substrate and both coated samples. In the case of uncoated surface H/E ratio is of one order of magnitude lower than for DLC coating and Ag-doped DLC coating: 0.02, 0.12 and 0.11, respectively (TABLE 4). According to papers cited above obtained results may lead to a conclusion that tribological behaviour (wear resistance) of coated samples is far more beneficial than this of bare substrate. Although, more advanced tribological test should be conducted to prove these findings. Moreover, use of different concentrations of Ag ions embedded in DLC coating by ion implantation can be an effective way to optimise coating anti-wear properties for medical applications (i.e. fixation of the intramedullary nails).

### Mikroskopia sił atomowych AFM

Wyniki badań mikroskopii sił atomowych przedstawiono na RYS. 5. Na skanach 3D analizowanych podłoży widoczne są wyraźne zmiany w topografii obydwu typów podłoża. Struktura powłoki domieszkowanej srebrem wydaje się być bardziej niejednorodna. Na całym analizowanym obszarze widoczne są losowo rozmieszczone zagłębienia, których obecność wynikać musi z samego charakteru procesu implantacji jonów. Na skanie 3D polerowanego podłoża stalowego, widocznych jest kilka rys, których głębokość nie przekracza 8 nm, podczas gdy parametr chropowatości Ra na całej powierzchni pozostaje na bardzo niskim poziomie rzędu 0,6 nm.

Jak wynika z pomiarów struktury geometrycznej powierzchni (TABELA 5) obie wartości parametrów chropowatości wykazują tendencję wzrostową w następującej kolejności: wypolerowana stal AISI 316LVM, powłoka DLC oraz powłoka DLC domieszkowana srebrem. Wartości parametrów chropowatości powłoki DLC oraz powłoki DLC domieszkowanej srebrem w porównaniu z niemodyfikowanym podłożem są odpowiednio podwojone oraz potrojone. Wyniki przeprowadzonych badań nie są w zgodzie z tymi przedstawionymi w pracy [21], gdzie w wyniku implantacji jonów Ti do warstwy DLC autorzy zaobserwowali obniżenie parametrów chropowatości. Jednakże należy nadmienić, że badanie powłoki węglowej wytworzone zostały metodą rozpylania magnetronowego, a nie metodami CVD. W ten sposób wyjściowe wartości parametrów chropowatości powłoki mogły być wyższe w porównaniu z tymi, uzyskanymi za pomocą metod CVD. Wyższe wartości parametrów chropowatości mogą sprzyjać procesom kolonizacji bakterii, dlatego też parametr ten powinien być brany pod uwagę w dalszych badaniach biologicznych.

### Atomic force microscopy (AFM)

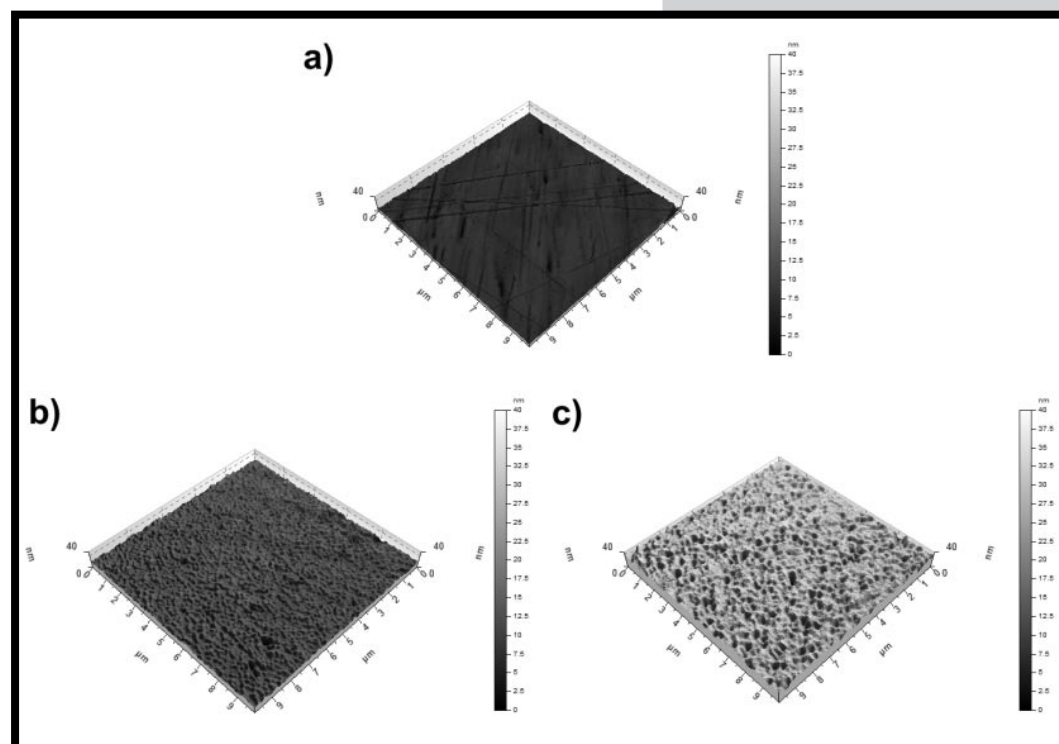
Results from the atomic force microscopy are presented in FIG. 5. On the 3D scans of analyzed samples some changes in the surface topography of both types of coatings are visible. Structure of Ag-doped coating seems to be more heterogeneous. Randomly distributed deep pits are visible on the whole analyzed area, which must be related to the character of the implantation process itself. On the 3D scan of bare substrate surface, although it is mirror polished, some scratches are visible but their depth does not exceed 8 nm while roughness parameter Ra remains on very low level of 0.6 nm on entire surface.

As it is apparent from measurements of the geometrical structure (TABLE 5), both values of roughness parameters show increasing tendency in the following order: mirror polished steel substrate, DLC coating and Ag-doped DLC coating. The values of roughness parameters for DLC coating and Ag-doped coating compared to bare substrate are doubled and tripled, respectively. Observed results are inconsistent with those presented in work [21], where after the implantation of Ti ions into DLC layer authors reported decreased surface roughness. However, it should be noted that investigated carbon layers were synthesized by means of the magnetron sputtering process, not CVD technique, thus the output roughness could be much higher than that for CVD layers. Higher roughness may be in favour of bacteria colonization, therefore this parameter should be taken into consideration in further biological examinations.

**TABELA 5. Parametry chropowatości zgodnie z normą ISO 4287.**

**TABLE 5. Roughness parameters according to the ISO 4287 standard.**

Próbka / Samples	Parametry chropowatości / Roughness parameters [nm]	Średnia / Mean	Odch. Stand. / Std dev	Min	Max
AISI 316LVM / Stainless steel	Ra	0.61	0.13	0.40	1.01
	Rz	4.43	0.88	2.45	7.44
DLC / DLC coating	Ra	1.18	0.21	0.81	1.78
	Rz	6.93	1.48	4.44	12.20
DLC - Ag / Ag-doped DLC coating	Ra	2.01	0.45	1.26	3.32
	Rz	11.60	3.30	6.04	23.40



**RYS. 5. Skany AFM 3D badanych powierzchni:**

a) AISI 316LVM;  
b) AISI 316LVM z wytworzoną powłoką DLC;  
c) AISI 316LVM z domieszkowaną srebrem powłoką DLC.

**FIG. 5. 3D AFM scans of investigated surfaces:**  
a) AISI 316LVM;  
b) AISI 316LVM coated with DLC;  
c) AISI 316LVM coated with DLC, Ag-doped.

1. Implantacja jonów srebra wpływa na swobodną energię powierzchniową powłok węglowych. SEP domieszkowanych srebrem powłok węglowych jest o 19% mniejsza niż powłok niedomieszkowanych. Składowa polarna SEP wzrosła dla powłok domieszkowanych srebrem, co oznacza wyższe powinowactwo do cieczy o charakterze polarnym.

2. Implantacja jonów o koncentracji rzędu 0,5% nie wpływa na właściwości mechaniczne (twardość, moduł sprężystości) powłok węglowych.

3. Wartość parametru H/E powłok DLC oraz powłok domieszkowanych srebrem jest znacznie wyższa w porównaniu ze stałą AISI 316LVM. Można wnioskować, że właściwości trybologiczne (odporność na zużycie) próbek modyfikowanych są znacznie bardziej korzystne w porównaniu ze stałą.

4. Wartości parametrów chropowatości badanych powierzchni zależne są od procesu modyfikacji. Dla powłoki węglowej parametry te wzrosły dwukrotnie, podczas gdy dla powłoki domieszkowanej jonami srebra wzrost był trzykrotny w stosunku do polerowanego podłoża stalowego.

5. Wyższe wartości parametrów chropowatości mogą sprzyjać procesom kolonizacji bakterii, dlatego też topografia powierzchni powinna być brana pod uwagę w dalszych badaniach biologicznych.

## Podziękowania

Praca finansowana ze środka Narodowego Centrum Badań i Rozwoju w ramach projektu ERA-NET/ MNT/ CARSILA/1/2010. Autorzy pragną również podziękować dr Bogusławowi Rajchelowi z Instytutu Fizyki Jądrowej Polskiej Akademii Nauk za implantację jonów srebra.

## Piśmiennictwo

- [1] European Market for Orthopedic Trauma Devices 2010, iData Research, Inc., 2010.
- [2] C. Valero Vidal, A. Igual Muñoz: Electrochemical characterisation of biomedical alloys for surgical implants in simulated body fluids. *Corrosion Science* 50 (2008) 1954-1961.
- [3] E. Skolek-Stefaniszyń, J. Kamiński, J. Sobczak, T. Wierzchoń: Modifying the properties of AISI 316L steel by glow discharge assisted low-temperature nitriding and oxynitriding. *Vacuum* 85 (2010) 164.
- [4] S. Mitura, P. Niedzielski, B. Walkowiak (eds), NANODIAM, New technologies for medical applications: studying and production of carbon surfaces allowing for controllable bioactivity. PWN, Warszawa.
- [5] F. Z. Cui, D. J. Li: A review of investigations on biocompatibility of diamond-like carbon and carbon nitride films. *Surface and Coatings Technology*, 131 (2000) 481-487.
- [6] D. Batory, J. Grabarczyk, W. Kaczorowski: Mechanical characterization of carbon-based layers onto UHDPE. *Engineering of Biomaterials* 76 (2008) 24-27.
- [7] J. Grabarczyk, D. Batory, P. Louda, P. Couvrat, I. Kotela, K. Bakowicz-Mitura: Carbon coatings for medical implants. *Journal of Achievements in Materials and Manufacturing Engineering*, 1-2 (2007) 107-111.
- [8] W. Jakubowski, G. Bartosz, P. Niedzielski, W. Szymanski, B. Walkowiak: Nanocrystalline diamond surface is resistant to bacterial colonization, *Diamond and Related Materials*, 13 (2004) 1761-1763.
- [9] W. Szymański, D. Batory, M. Cłapa, L. Klimek: Mechanical properties of a C:H/Ti layers on prosthodontic CoCr and NiCr alloys. *Engineering of Biomaterials* 85 (2009) 2-5.
- [10] D. Batory, J. Grabarczyk, W. Kaczorowski: Mechanical characterization of carbon-based layers onto UHDPE. *Engineering of Biomaterials* 76 (2008) 24-27.
- [11] D. Batory, T. Błaszczak, M. Cłapa, S. Mitura: Investigation of anti-corrosion properties of Ti-C gradient layers manufactured in hybrid deposition system. *Journal of Materials Science* 10 (2008) 3385-3391.

## Conclusions

1. The implantation of silver ions influences the surface free energy of DLC coatings. SFE for Ag-doped DLC coating is 19% lower than for DLC coating. However the polar component of SFE increased for Ag-doped DLC, which means higher affinity to polar liquids.

2. The implantation of silver ions in mentioned concentration does not affect the mechanical properties (hardness and modulus) of DLC coatings.

3. H/E ratio of DLC and Ag-doped coating is significantly higher than of AISI 316LVM steel. This may lead to a formulation of hypothesis that tribological behaviour (wear resistance) of coated samples would be far more beneficial than of bare substrate.

4. Roughness parameters of analyzed substrates depend on surface modification process. For the carbon layer these parameters increase twice, whereas for Ag-doped are tripled compared to bare steel substrate.

5. Higher roughness values may be in favour of bacteria colonization, therefore the surface topography should be taken into consideration in further biological examinations.

## Acknowledgments

*This work has been supported by the National Centre for Research and Development under grant no. ERA-NET/ MNT/ CARSILA/1/2010. Authors would also like to thank dr. Bogusław Rajchel from the Institute of Nuclear Physics Polish Academy of Science for the implantation of silver ions.*

## References

- [12] F. R. Marciano, L. F. Bonetti, L. V. Santos, N. S. Da-Silva, E. J. Corat, V.J. Trava-Airoldi: Antibacterial activity of DLC and Ag-DLC films produced by PECVD technique. *Diamond Related Materials* 18 (2009) 1010.
- [13] S.C.H. Kwok, W. Zhang, G. J. Wan, D. R. McKenzie, M. M. M. Bilek, P. K. Chu: Hemocompatibility and anti-bacterial properties of silver doped diamond-like carbon prepared by pulsed filtered cathodic vacuum arc deposition. *Diamond Related Materials* 16 (2007) 1353.
- [14] N. M. Chekan, N. M. Beliauskii, V. V. Akulich, L. V. Pozdniak, E. K. Sergeeva, A. N. Chernov, V. V. Kazbanov, V. A. Kulchitsky: Biological activity of silver-doped DLC films. *Diamond Related Materials* 18 (2009) 1006.
- [15] H. S. Zhang, J. L. Endrino, A. Anders: Comparative surface and nano-tribological characteristics of nanocomposite diamond-like carbon thin films doped by silver. *Applied Surface Science* 255 (2008) 2551.
- [16] H. W. Choi, J. H. Choi, K. R. Lee, J. P. Ahn, K. H. Oh: Structure and mechanical properties of Ag-incorporated DLC films prepared by a hybrid ion beam deposition system. *Thin Solid Films* 516 (2007) 248.
- [17] D. K. Owens, R. C. Wendt: Estimation of the surface free energy of polymers. *Journal of Applied Polymer Science* 13 (1969) 1741-1747.
- [18] G. M. Pharr, W. C. Oliver: An improved technique for determining hardness and elastic modulus using load and displacement sensing indentation experiments. *Journal of Materials Research* 7 (1992) 613-617.
- [19] A. Leyland, A. Matthews: On the significance of the H/E ratio in wear control: a nanocomposite coating approach to optimised tribological behaviour. *Wear* 246 1-2 (2000) 1-11.
- [20] J. Musil, F. Kunc, H. Zeman, H. Poláková: Relationships between hardness, Young's modulus and elastic recovery in hard nanocomposite coatings. *Surface and Coatings Technology* 154 2-3 (2002) 304-313.
- [21] L. Cui, L. Guoqing, C. Wenwu, M. Zongxin, Z. Chengwu, W. Liang: The study of doped DLC films by Ti ion implantation. *Thin Solid Films* 475 (2005) 279-282.



# WSTĘPNA ANALIZA WŁAŚCIWOŚCI POWŁOK WĘGLOWYCH WYTWARZANYCH ZA POMOCĄ METODY MW/RF NA POWIERZCHNI PIROLITYCZNEGO WĘGLA

AGATA KRÓL, TOMASZ KAŻMIERCZAK, WITOLD KACZOROWSKI\*

INSTYTUT INŻYNIERII MATERIAŁOWEJ, POLITECHNIKA ŁÓDZKA  
UL. STEFANOWSKIEGO 1/15, 90-924 ŁÓDŹ

\* E-MAIL: WITOLD.KACZOROWSKI@GMAIL.COM

## Streszczenie

*W prezentowanej pracy przedstawiono wstępną analizę możliwości wytwarzania powłok węglowych z wykorzystaniem metody MW/RF PACVD na powierzchni pirolitycznego węgla (PyC). Modyfikacja tego materiału ma wpłynąć na poprawę jego biokompatybilności, a także zagwarantować jak najlepsze właściwości fizyko-mechaniczne. Oceny wytworzonych powłok dokonano z wykorzystaniem skaningowej mikroskopii elektronowej, urządzenia do pomiaru kąta zwilżania oraz tribotestera. Procesy modyfikacji próbek z PyC przeprowadzone zostały ze zmiennym czasem wytwarzania (5 lub 30 min), a szczególną uwagę zwrócono na wpływ ujemnego potencjału autopolaryzacji. Zaprezentowane wyniki pokazały wpływ czasu procesów modyfikacji na uzyskiwaną morfologię powierzchni. Okazało się, że najkrótsze procesy umożliwiają uzyskanie najmniej rozwiniętej powierzchni, natomiast przy dłuższych procesach morfologia powierzchni była zbliżona do powierzchni próbek PyC bez modyfikacji. Każda z zastosowanych modyfikacji wpłynęła na zmianę kąta zwilżania oraz wartości swobodnej energii powierzchniowej (SEP). Dla krótkich procesów wartości SEP wynosiły około  $45 \text{ mJ/m}^2$  a w przypadku długich procesów parametr ten ulegał nieznacznemu obniżeniu do wartości około  $43 \text{ mJ/m}^2$ . Wytworzone powłoki węglowe w większości gwarantowały obniżenie współczynnika tarcia, najniższe jego wartości (około 0,12) uzyskano dla procesów pięciominutowych.*

*Na podstawie zaprezentowanych wyników można wywnioskować, że najbardziej obiecujące są modyfikacje PyC z zastosowaniem krótkich czasów wytwarzania przy ujemnym potencjale autopolaryzacji około -500 V. Aktualnie trwają dalsze prace mające na celu optymalizację powłok węglowych na podłożu pirolitycznego węgla.*

**Słowa kluczowe:** PyC, MW/RF, powłoki węglowe, plazma, zwilżalność

[Inżynieria Biomateriałów, 105, (2011), 13-19]

## Wprowadzenie

Pirolityczny węgiel (PyC) jest materiałem węglowym, który ze względu na swoje właściwości znalazł zastosowanie w medycynie, szczególnie w budowie mechanicznych zastawek serca [1,2]. Podłoże to wykazuje się dużą trwałością i odpornością na zużycie [1], jednak w kontakcie z krwią charakteryzuje je niezadawalająca trombogenność [3].

# PROPERTIES OF CARBON COATINGS DEPOSITED ON PYROLYTIC CARBON USING MW/RF METHOD - PRELIMINARY ANALYSIS

AGATA KRÓL, TOMASZ KAŻMIERCZAK, WITOLD KACZOROWSKI\*

INSTITUTE OF MATERIALS SCIENCE AND TECHNOLOGY,  
TECHNICAL UNIVERSITY OF ŁÓDŹ,  
STEFANOWSKIEGO STR. 1/15, 90-924 ŁÓDŹ, POLAND

\* E-MAIL: WITOLD.KACZOROWSKI@GMAIL.COM

## Abstract

*In this paper a preliminary analysis of deposition of carbon coatings on the surface of pyrolytic carbon using MW/RF PACVD method is presented. Modification of this material is intended to improve its biocompatibility and provide good physical and mechanical properties. Evaluation of deposited films was performed using scanning electron microscopy, wettability angle measuring device and tribotester. Deposition processes were focused on the influence of bias voltage, conducted using two deposition times (5 and 30 minutes). Results showed the influence of deposition time on samples surface morphology. Less extended surfaces were obtained during short time of deposition process. 30 minute processes resulted in surface morphology similar to unmodified PyC. Each modification influenced changes in wettability angles and the value of surface free energy (SFE). After short plasma processes SFE was around  $45 \text{ mJ/m}^2$ , in the case of longer processes this value decreased slightly to  $43 \text{ mJ/m}^2$ . Most of the samples showed lower friction coefficient (CoF) compared to unmodified pyrolytic carbon. Lowest CoF values (about 0.12) were obtained during 5 minutes processes.*

*On the basis of shown research it can be concluded that most promising are short time modifications of PyC using -500 V bias voltage. Further research is currently taking place, which is meant to improve carbon films deposited on pyrolytic carbon substrate.*

**Keywords:** PyC, MW/RF, carbon coatings, plasma, wettability

[Engineering of Biomaterials, 105, (2011), 13-19]

## Introduction

Pyrolytic carbon (PyC) is a carbon material, which thanks to its properties found application in medicine, especially in construction of mechanical heart valve prostheses [1,2]. This substrate exhibits great durability and wear resistance [1], however in contact with blood it has unsatisfying thrombogenicity [3].

One of the most common reasons of a failure of mechanical heart valve prostheses is excessive blood coagulation, caused by presence of a foreign material in the human body [4]. Therefore a drive for perfection in the case of biomaterials used in cardiosurgery is fully understandable.

Plasma vapor deposition techniques are becoming more popular for modification of materials applied in medicine, due to possibility of change of surface properties [5,6].

Jedną z najczęstszych przyczyn dysfunkcji mechanicznych zastawek serca jest nadmierna krzepliwość krwi spowodowana obecnością obcego materiału [4], stąd też potrzeba ciągłego udoskonalania biomateriałów mających zastosowanie w kardiochirurgii.

Do modyfikacji podłoży stosowanych w medycynie coraz częściej wykorzystywane są techniki plazmowe pozwalające na kontrolowaną zmianę właściwości [5,6]. Modyfikacje te wpływają na różnicowanie grup funkcyjnych na powierzchni, od których zależy swobodna energia powierzchniowa [7]. Badania pokazują, że parametr ten jest powiązany z ilością adsorbowanej albuminy i fibrynogenu, a stosunek zaabsorbowanych ilości tych dwóch białek osocza bezpośrednio wpływa na zachowanie materiału w kontakcie z krwią [7,8].

Procesy plazmowe mogą mieć też na celu wytworzenie specjalnej powłoki [9,10]. Jedną z bardzo często stosowanych w celach biomedycznych modyfikacji jest wytwarzanie na powierzchni biomateriałów powłok węglowych (np. DLC – diamond-like carbon, czy NCD – nanocrystalline diamond) [11,12]. Wykorzystuje się je w celu poprawy właściwości tribologicznych, odporności na zużycie, a także biokompatybilności i odporności korozyjnej. Warto podkreślić, że właściwości takich powłok są w znacznym stopniu zależne od metody i zastosowanych parametrów wytwarzania, które muszą być odpowiednio dobrane w zależności od podłoża.

W pracy przedstawiono wyniki badań podłoży PyC modyfikowanych w zróżnicowanych procesach plazmowych. Naszym celem było określenie zależności pomiędzy parametrami procesu i właściwościami wytwarzanych powłok, a następnie wyselekcjonowanie najlepszych warunków modyfikacji do dalszych badań.

## Materiały i metody

W prezentowanej pracy wykorzystano próbki z PyC w postaci krążków o średnicy 14 mm i wysokości 2 mm, które przed procesem modyfikacji były myte w myjce ultradźwiękowej w alkoholu izopropylowym. Po osuszeniu podłoża montowane były na elektrodzie wysokiej częstotliwości urządzenia MW/RF PACVD (microwave/radio frequency plasma assisted chemical vapor deposition) [13]. Procesy modyfikacji próbek z PyC przeprowadzone zostały ze zmiennym czasem wytwarzania (5 lub 30 min), a szczególną uwagę zwrócono na wpływ ujemnego potencjału autopolaryzacji. Przeanalizowano podłoża zmodyfikowane od -400 do -800 V. Wszystkie procesy przeprowadzone zostały przy stałej wartości mocy mikrofalowej 500 W.

Po procesach modyfikacji morfologia powierzchni próbek scharakteryzowana została z wykorzystaniem skaningowej mikroskopii elektronowej SEM. Przeanalizowano wpływ modyfikacji na kąt zwilżania oraz swobodną energię powierzchniową, a także przeprowadzono wstępną ocenę ich właściwości tribologicznych. Badania zwilżalności wykonano na urządzeniu EasyDrop DSA15B firmy Kruss.

Badania tribologiczne wykonano na triboteście T-11M przy wykorzystaniu jako przeciwpółki kulki wykonanej z tlenku cyrkonu  $ZrO_2$  o średnicy  $6,4 \cdot 10^{-3}$  m. Badania przeprowadzono z wykorzystaniem prędkości liniowej kulki 0,05 m/s i obciążenia 5 N. Warunki testu przedstawia TABELA 1.

Modification of a substrate with plasma influences surface free energy, which is related to functional groups on the surface [7]. According to several studies, this property of the material is linked with albumin to fibrinogen adsorption ratio. Amounts of these two blood plasma proteins adsorbed on the surface, directly influences its behavior in contact with blood [7,8].

Another objective of plasma processes may be deposition of special coating [9,10]. One of most common modifications, applied for biomedical purposes, is deposition of carbon coatings on the surface of biomaterials (e.g. DLC – diamond-like carbon, or NCD – nanocrystalline diamond) [11,12]. They are usually created in order to improve tribological properties, wear resistance, biocompatibility and corrosion resistance. Characteristics of such films are dependent in certain degree on method and parameters of deposition, which have to be selected in accordance to covered substrate.

This study presents results of examination of PyC substrate modified with variable plasma processes. The goal was to investigate relation between parameters of the process and properties of carbon coating, then selection of the best conditions for deposition of such films on pyrolytic carbon.

## Materials and methods

Samples from PyC in the form of spherical discs of a diameter 14 mm and thickness of 2 mm were used for the purpose of conducted tests. Prior to modification process substrates were cleaned in ultrasonic cleaner in isopropyl alcohol. After drying, they were mounted on electrode of high frequency of MW/RF PACVD (microwave/radio frequency plasma assisted chemical vapor deposition) device [13]. Processes of modification of the samples were of different durations (from 5 to 30 min). Influence of negative bias at the substrate was taken into consideration. Substrates modified with this parameter within range from -400 to -800 V were analyzed. All PACVD processes were conducted with constant value of RF power equal to 500 W.

After modification processes morphology of surface of the samples was characterized with scanning electron microscopy SEM. Influence of modification on wettability and surface free energy was analyzed, after that primary evaluation of tribological properties was carried out. Wettability test was done using Kruss Easy Drop DSA15B device. Tribological studies were conducted on tribotester T-11M using zirconium oxide  $ZrO_2$  counter-specimen of a diameter of  $6,4 \cdot 10^{-3}$  m. Sliding tests were carried out at conditions of 5 N load and linear velocity of 5 m/s. Conditions of the test are presented in the TABLE 1.

**TABELA 1. Parametry badań tribologicznych.**  
**TABLE 1. Tribological investigations parameters.**

temperatura powietrza / air temperature [°C]	wilgotność powietrza / humidity [%]	droga / sliding distance [m]	prędkość liniowa / linear velocity [m/s]	obciążenie / load [N]
25	30	500	0.05	5

## Wyniki i dyskusja

W pracy przedstawiono wyniki ze wstępnych badań nad możliwością modyfikacji powierzchni węgla pirolitycznego powłokami węglowymi. Analiza literaturowa potwierdziła zainteresowanie badaczy tym zagadnieniem, jednak ilość publikacji na ten temat jest znikoma [14, 15]. Większość prac koncentruje się na modyfikacji podłoża PyC z zastosowaniem wysokich temperatur (powyżej 600°C). Pokazują one, że istnienie możliwość powiązania parametrów procesu z rozwinieciem powierzchni.

W ramach przeprowadzonych badań przeanalizowano wpływ parametrów procesów plazmowych na morfologię powierzchni węgla pirolitycznego, zmianę energii powierzchniowej oraz uzyskiwane wartości współczynnika tarcia (CoF). W pracy wykorzystano urządzenie MW/RF PACVD. Dzięki szerokim możliwościom zastosowanego systemu do modyfikacji podłoża PyC uzyskano pełną powtarzalność wyników [13]. Próbkę modyfikowane były według parametrów zawartych w TABELI 2.

Wpływ zastosowanych modyfikacji plazmowych na morfologię powierzchni pirolitycznego węgla zbadany został przy pomocy skaningowego mikroskopu elektronowego. Na RYS. 1-3 zamieszczono zdjęcia SEM porównujące morfologię próbek przed oraz po modyfikacjach.

Niezmodyfikowany PyC (RYS. 1) posiada jednorodną i rozwiniętą powierzchnię. Zdjęcie SEM w dużym powiększeniu uwidacznia jego typową strukturę w postaci płatków.

Efekt modyfikacji plazmowych różni się w zależności od czasu procesu. Próbkę poddane krótszym procesom wykazują w miarę jednorodną powierzchnię pozbawioną płatków (RYS. 2), podczas gdy długi czas procesu powodował silne rozwiniecie powierzchni, znacznie przekraczające niezmodyfikowane próbki (RYS. 3)

Analizując uzyskane wyniki można stwierdzić, że ze względu na rozwiniecie powierzchni najbardziej obiecujące są rezultaty uzyskane przy krótkich procesach modyfikacji oraz ujemnym potencjale autopolarizacji około 500 V. Można spodziewać się, że im bardziej będzie rozwinięta powierzchnia PyC tym gorsze będą jej wyniki badań biologicznych. Stopień rozwinięcia jest istotny z punktu widzenia adhezji do powierzchni szczepów bakterii *S. epidermidis* oraz *P. aeruginosa*, mogących doprowadzić do procesów zapalnych [16]. W związku z tym, zastosowanie wybranych parametrów modyfikacji plazmowej może pozwolić na zmniejszenie ryzyka wystąpienia tego typu powikłań. Prace nad optymalizacją rozwinięcia powierzchni będą realizowane w dalszym cyklu planowanych badań.

## Results and discussions

In this paper, preliminary analysis of possibility of modifying pyrolytic carbon's surface with carbon films is presented. Analysis of the literature proved there is an interest in this field among researchers, however there is a small number of publications in this topic [14, 15]. Most of them focus on modifying PyC substrates using high temperatures (over 600°C), however they show there is a connection between process parameters and extension of the surface.

In frame of presented study the influence of plasma processes parameters on pyrolytic carbon surface morphology, surface free energy and CoF was analyzed. MW/RF PACVD apparatus was used in this research. Thanks to a wide range of capabilities of this system applied to PyC modifications, a high repeatability of results was achieved. Samples were modified according to the parameters included in TABLE 2.

**TABELA 2. Parametry procesów wytwarzania powłok węglowych.**

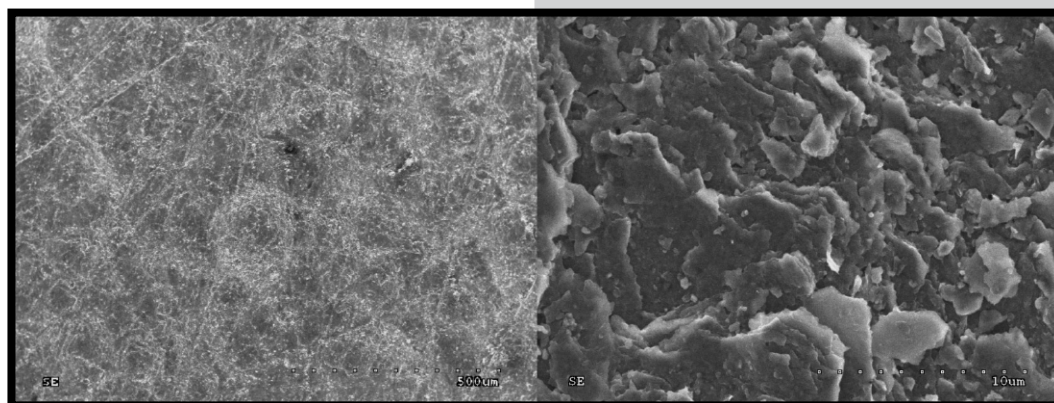
**TABLE 2. Plasma processes parameters.**

oznaczenie próbki / signature of samples	czas procesu / time of deposition [min]	potencjał / bias [-V]
PyC_1	5	400
PyC_2	5	500
PyC_3	30	600
PyC_4	30	800

Influence of plasma modifications on the surface of pyrolytic carbon was analyzed using scanning electron microscopy. FIGs 1-3 show comparison of modified and unmodified samples. Unmodified PyC (FIG. 1) has uniform and extended surface. High magnification reveals its typical flake-like structure.

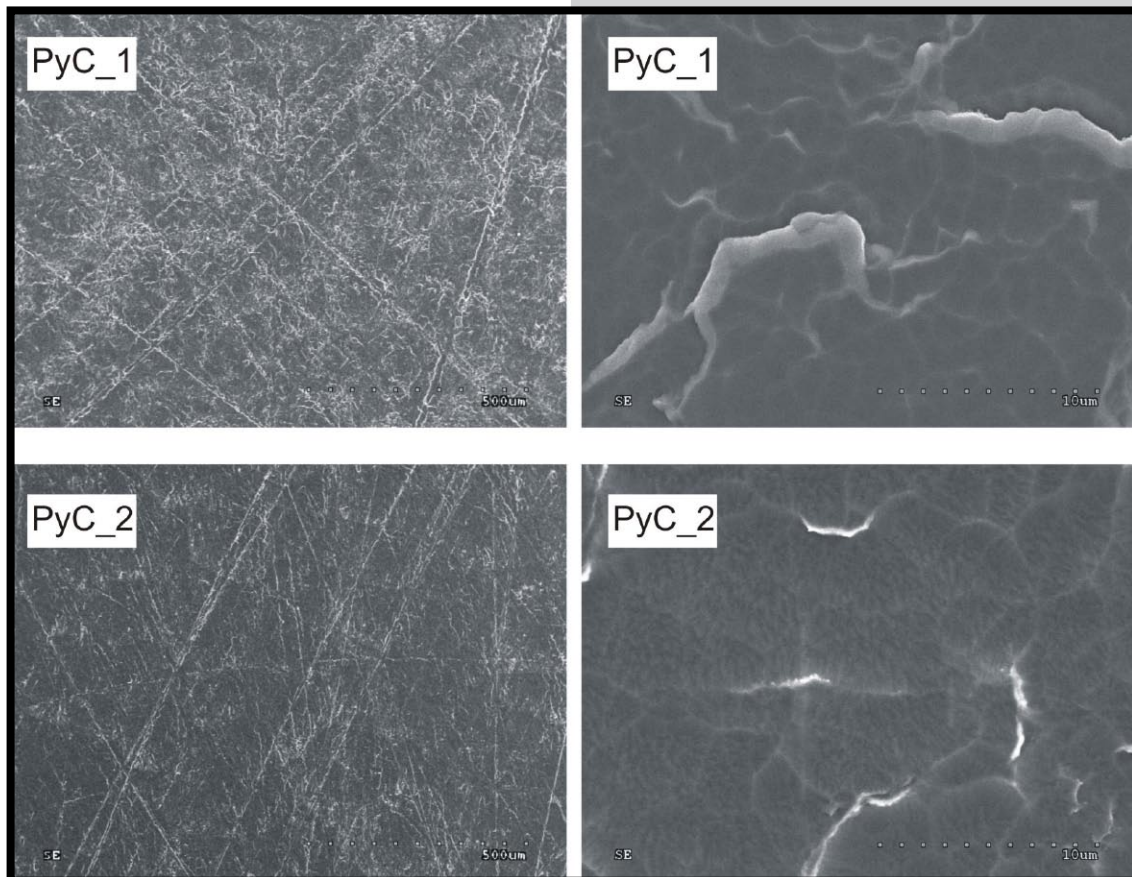
Effects of modifications changed with used time of deposition process. Samples modified during short processes showed uniform surface without flake-like structures (FIG. 2) while longer time of process resulted in high level of extension of surface, higher than unmodified PyC (FIG. 3).

Analyzing the results it can be stated, that due to surface extension, most promising are results obtained during short modifications and bias voltage around 500 V. It can be expected, that the more extended surface of PyC the worse biological tests results of it will be. Degree of extension is highly important from the standpoint of adhesion of *S. epidermidis* and *P. aeruginosa* bacteria to the surface, which can lead to inflammation [16]. Therefore, the use of short-term plasma modifications can reduce the risk of such complications. Work on optimizing the extension of the surface will be implemented in further series of planned studies.

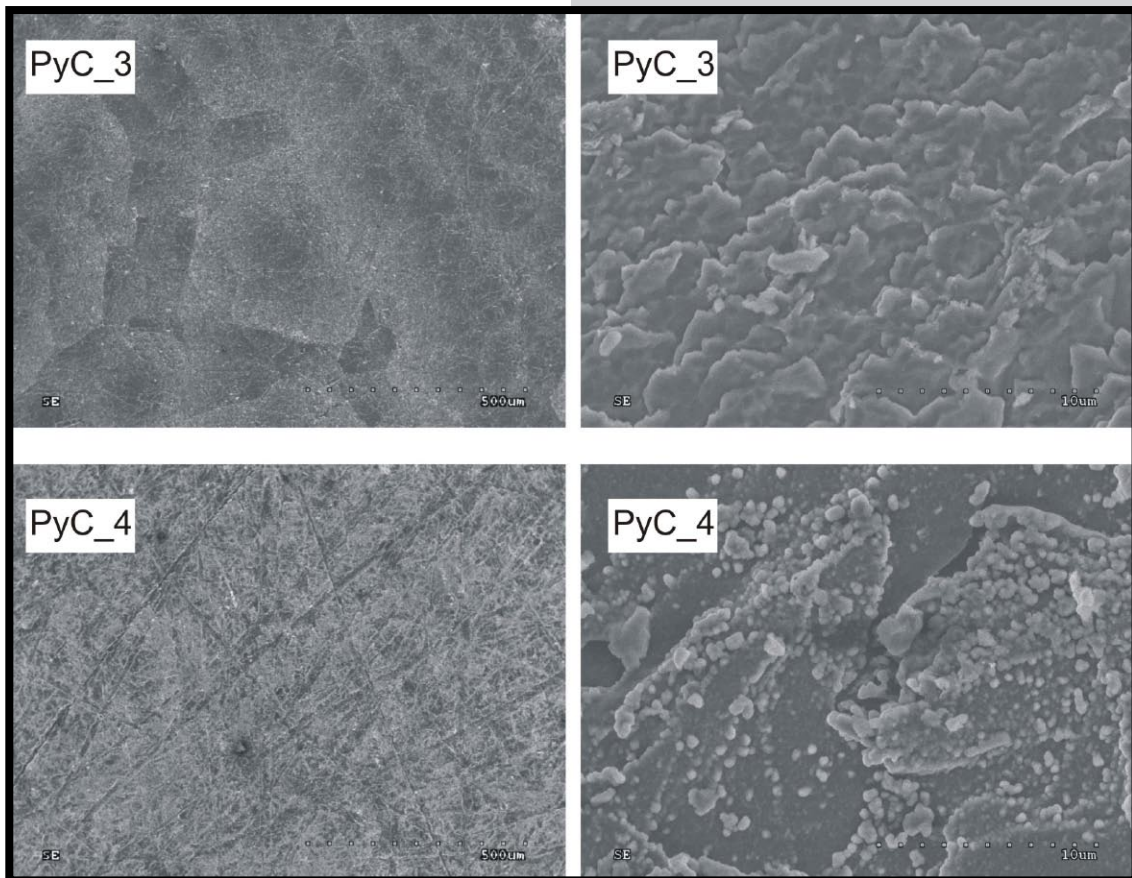


**RYS. 1. Zdjęcia SEM PyC.**  
**FIG. 1. SEM pictures of PyC.**



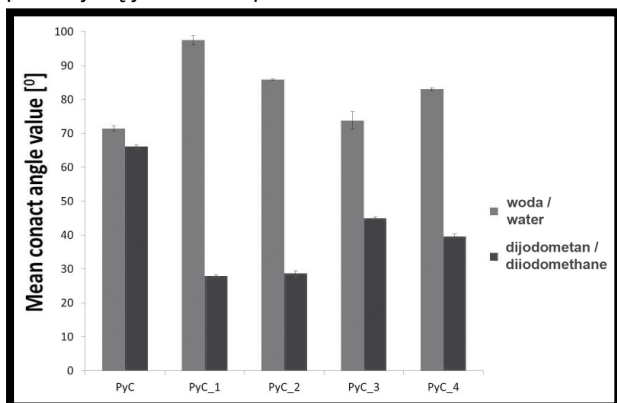


RYS. 2. Zdjęcia SEM PyC zmodyfikowanego w procesie PyC\_1 oraz PyC\_2.  
 FIG. 2. SEM pictures of modified PyC using processes PyC\_1 and PyC\_2.



RYS. 3. Zdjęcia SEM PyC zmodyfikowanego w procesie PyC\_3 oraz PyC\_4.  
 FIG. 3. SEM pictures of modified PyC using processes PyC\_3 and PyC\_4.

Wytworzenie na powierzchni PyC powłoki węglowej skutkowało także zmianami w swobodnej energii powierzchniowej. Wielkość ta zmierzona została za pomocą metody Owensa – Wendta na podstawie analizy kątów zwilżania powierzchni dla dwóch cieczy: wody destylowanej jak i diiodometanu (jodku metylenu). Na próbkach pokrytych powłoką węglową, krople jodku metylenu silniej zwilżają powierzchnię (uzyskano kąty od około 28 do 45 stopni) podczas gdy kąt zwilżania dla wody oscyluje w granicach 72-97 stopni, wskazując na hydrofobowy charakter powierzchni. Wynika z tego, że w porównaniu do powierzchni PyC bez powłok węglowych, zmodyfikowane plazmowo powierzchnie wykazują silniejsze powinowactwo do jodku metylenu oraz mniejsze powinowactwo do wody. Potwierdzeniem tego są pomiary kąty zwilżania przedstawione na RYS. 4.



**RYS. 4. Zmiany średnich wartości kątów zwilżania dla wody i diiodometanu.**

**FIG. 4. Changes in mean values of contact angles of distilled water and diiodomethane.**

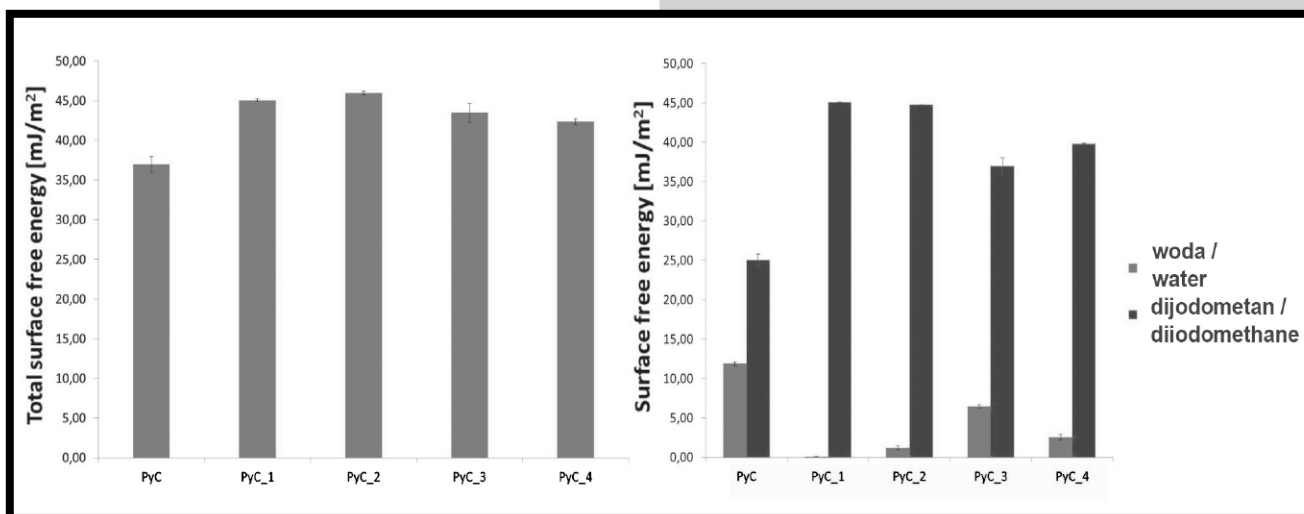
Obliczona swobodna energia powierzchniowa ukazuje wpływ modyfikacji plazmowych na ten parametr. Jest ona między innymi jednym z czynników decydujących o możliwości tworzenia się biofilmu na powierzchni implantu [16]. Wartość całkowitej swobodnej energii powierzchniowej jest wyższa dla próbek zmodyfikowanych powłokami węglowymi. Jest to skutkiem obniżenia składowej polarnej oraz wzrostu składowej dyspersyjnej swobodnej energii powierzchniowej. Przedstawione wyniki wskazują, że wyższe wartości tego parametru uzyskano dla modyfikacji pięciominutowych (RYS. 5). Dla krótkich procesów całkowite wartości SEP wynosiły około 45 mJ/m<sup>2</sup> a w przypadku długich procesów jej wartość uległa nieznacznemu obniżeniu do około 43 mJ/m<sup>2</sup>.

Deposition of carbon film on the surface of pyrolytic carbon resulted in changes of the value of surface free energy. This parameter was measured using Owens – Wendt method by analyzing wettability angles of two liquids: distilled water and diiodomethane. Surfaces covered with carbon layer show lower values of contact angle when diiodomethane was used (28 to 45 degrees), whereas the contact angle of water was around 72-97 degrees, indicating hydrophobic character of the surface. These results show, that plasma modified surfaces have higher affinity with diiodomethane and lower affinity with water, compared to unmodified surface. It is confirmed by wettability angles shown in FIG. 4.

Calculated surface free energy shows the influence of plasma modifications on this parameter. It is one of the factors responsible for formation of biofilm on the surface of an implant. The total value of SFE is higher when samples modified with carbon coatings are concerned. This is a result of lowering the polar component and increasing of dispersive component of SFE. Results show that highest values of this parameter are obtained when short time modifications are used (FIG. 5). After short plasma processes SFE was around 45 mJ/m<sup>2</sup>, in the case of longer processes this value decreased slightly to 43 mJ/m<sup>2</sup>.

Analysis of bias voltage and its influence on surface free energy shows, that -500 V voltage results in highest values of SFE. When the voltage bias is lower or higher than this value the decreasing of surface free energy was observed (FIG. 5). Observed possibilities of changing surface free energy can be helpful in minimizing the risk of complications. In addition, the results obtained for unmodified samples are comparable with the values of this parameter characteristic of the commercial implants made of pyrolytic carbon [16].

Estimation of tribological behavior of samples was performed by analyzing the friction coefficient (CoF). Most of the samples showed lower CoF compared to unmodified surfaces of pyrolytic carbon. Only sample PyC\_4 shows CoF value similar to the original PyC. Plasma modifications lasting 5 minutes resulted in obtaining surfaces with a friction coefficient lower (0.12) than unmodified PyC (0.18), which is directly related to lower level of surface extension, visible in SEM images. In the case of samples modified with carbon films during longer processes, an increase of friction coefficient is present, which is related to gradual wear of carbon film.



**RYS. 5. Zmiany wartości swobodnej energii powierzchniowej i jej składowych.**

**FIG. 5. Changes in surface free energy and its components.**



Analizując wpływ ujemnego potencjału na wartość SEP można zauważyć, że najwyższą wartością swobodnej energii powierzchniowej charakteryzują się podłoża zmodyfikowane przy potencjale -500 V. Zarówno wyższe jak i niższe wartości tego parametru powodują zmniejszenie wartości swobodnej energii powierzchniowej (RYS. 5). Zaobserwowane zmiany mogą być także pomocne w zminimalizowaniu ryzyka wystąpienia powikłań. Dodatkowo rezultaty uzyskane dla próbek bez modyfikacji są porównywalne z wartościami tego parametru charakterystycznymi dla komercyjnych implantów z węgla pirolitycznego [16].

Ocena wpływu modyfikacji na właściwości tribologiczne próbek dokonana została na podstawie analizy współczynnika tarcia. Większość próbek zmodyfikowanych powłoką węglową wykazała niższą wartość współczynnika tarcia w stosunku do niemodyfikowanego pirolitycznego węgla. Jedynie próbka PyC\_4 charakteryzowała się współczynnikiem tarcia na poziomie zbliżonym do podłoża bez modyfikacji. Modyfikacje plazmowe dokonane w czasie 5 minut doprowadziły do uzyskania współczynnika tarcia znacznie mniejszego (około 0,12) niż dla niemodyfikowanego PyC (0,18), co jest bezpośrednio związane z małym stopniem ich rozwinięcia powierzchni, widocznym na obrazach SEM. W przypadku próbek z powłokami wytworzonymi w dłuższych procesach uzyskiwano wyższe wartości współczynnika tarcia (od 0,15 do 0,18).

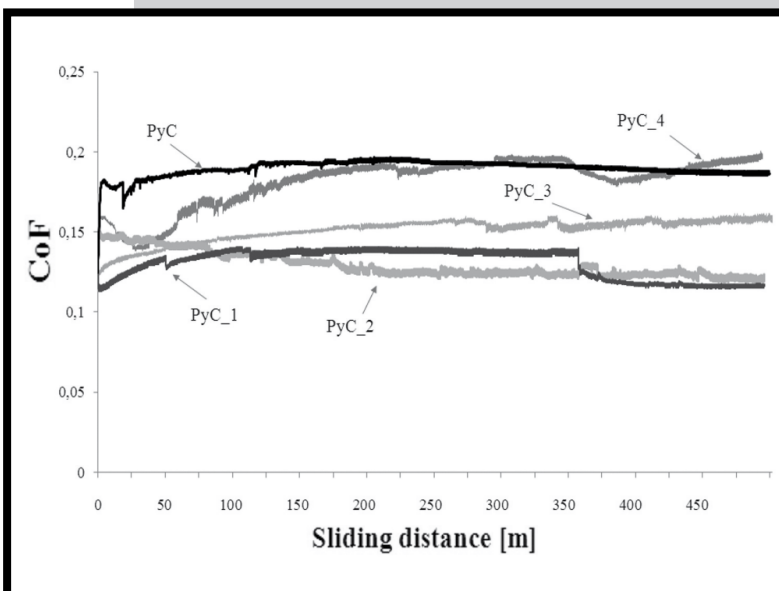
## Wnioski

Przedstawione rezultaty pokazują możliwości modyfikacji powierzchni PyC za pomocą powłok węglowych. Zrealizowane badania ze zmiennymi parametrami procesów plazmochemicznych umożliwiły analizę ich wpływu na morfologię, swobodną energię powierzchniową oraz współczynnik tarcia. Procesy modyfikacji przeprowadzono na urządzeniu MW/RF PACVD przy dwóch różnych czasach wytwarzania (5 i 30 min) oraz zmiennej od -400 do -800 V wartości ujemnego potencjału autopolaryzacji. Zaprezentowane wyniki badań wskazują na zależność rozwinięcia powierzchni od przedstawionych parametrów procesu. Okazało się, że najkrótsze procesy umożliwiają uzyskanie najmniej rozwiniętej powierzchni, natomiast przy dłuższych procesach morfologia powierzchni była zbliżona do powierzchni próbek PyC bez modyfikacji.

Każda z zastosowanych modyfikacji wpłynęła na zmianę kąta zwilżania oraz wartości swobodnej energii powierzchniowej. Dla krótkich procesów wartości SEP wynosiły około 45 mJ/m<sup>2</sup> a w przypadku długich procesów jej wartość ulegała nieznacznemu obniżeniu do około 43 mJ/m<sup>2</sup>.

Większość próbek zmodyfikowanych powłoką węglową wykazała niższy współczynnik tarcia w stosunku do niemodyfikowanego pirolitycznego węgla. Najniższe wartości współczynnika tarcia uzyskano dla krótkich procesów (około 0,12), co jest związane z ich morfologią powierzchni. Dla długich procesów wartość CoF była wyższa niż 0,15, a w przypadku zastosowania ujemnego potencjału -800 V była porównywalna z wartością CoF dla próbki PyC bez modyfikacji.

Na podstawie zaprezentowanych wyników można wywnioskować, że najbardziej obiecujące są krótkoterminowe modyfikacje PyC z zastosowaniem ujemnego potencjału autopolaryzacji około -500 V. Aktualnie trwają dalsze prace mające na celu optymalizację powłok węglowych na podłożu węgla pirolitycznego.



RYS. 6. Zmiany współczynnika tarcia dla PyC bez i z powłokami węglowymi.

FIG. 6. Changes in friction coefficient of PyC with and without carbon coatings.

## Conclusions

Results of the study present possibilities of modification of PyC surface by deposition of carbon coatings. Conducted test with variable parameters of plasma chemical processes enabled analysis their influence on morphology, surface free energy and friction coefficient. Processes of modification were carried out on MW/RF PACVD device with two different durations and variable negative bias (from 400 to 800 V). Presented results indicate that development of the surface is related to parameters of the processes. Short duration processes led to smooth, least developed surface, while longer time of deposition resulted in morphology of surface similar to unmodified PyC substrates.

Each of conducted modifications caused change in wettability and surface free energy. For short processes value of SFE was circa 45 mJ/m<sup>2</sup>, while in the case of longer processes this value was slightly lower, circa 43 mJ/m<sup>2</sup>.

Most of the samples with DLC coating exhibited lower value of friction coefficient in comparison with unmodified pyrolytic carbon. Lowest values of CoF (circa 0.12) were obtained for short modification processes, which can be related to their surface morphology. Longer processes of deposition resulted in value of CoF higher than 0.15. For the sample modified with negative bias of 800 V, friction coefficient value was comparable to results of unmodified PyC.

On the basis of the presented results, we can draw a conclusion that modification processes of short duration and negative bias circa -500 V are the most effective for pyrolytic carbon. Currently, work aimed at further improvement of carbon coatings on PyC substrate is being continued.



## Podziękowania

*Praca finansowana ze środków NCBiR w ramach projektu „Opracowanie typoszeregu dyskowych zastawek mechanicznych dla pediatrycznych komór wspomagania serca” o numerze NR13-0118-10/2011.*

## Acknowledgements

*The works have been financially supported within “Development of the type series of single disk artificial heart valves for paediatric ventricular assist devices” research project (NR13-0118-10/2011) by The National Centre for Research and Development.*

## Piśmiennictwo

- [1] H. Zhang, X. Deng, T. F. Cianciulli, Z. Zhang, D. Chappard, J. A. Lax, M. C. Saccheri, H. J. Redruello, J. L. Jordana, H. A. Prezioso, M. King, R. Guidoin: Clinical Device-Related Article Pivoting System Fracture in a Bileaflet Mechanical Valve: A Case Report, *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials*, Vol. 90B, 2 (2009) 952-961.
- [2] R. O. Ritchie, R. H. Dauskardt, Weikang Yu and A. M. Brendzel: Cyclic fatigue-crack propagation, stress-corrosion, and fracture-toughness behavior in pyrolytic carbon-coated graphite for prosthetic heart valve applications. *Journal of Biomedical Materials Research*, Vol. 24, 2 (1990) 189-206.
- [3] S.L. Goodman, K.S. Tweden, R.M. Albrecht: Platelet interaction with pyrolytic carbon heart-valve leaflets. *Journal of Biomedical Materials Research*, Vol. 32, 2 (1996) 249-258.
- [4] Vyarahare et al.: Vascular biomaterials devices and methods, Clemson University, Clemson, United States Patent, No. 6837903, published on 4.01.2005.
- [5] P. Favia, E. Sardella, R. Gristina, R. d'Agostino: Novel plasma processes for biomaterials: micro-scale patterning of biomedical polymers. *Surface and Coatings Technology*, Vol. 169-170 (2003) 707-711.
- [6] P.K. Chu: Plasma surface treatment of artificial orthopedic and cardiovascular biomaterials. *Surface & Coatings Technology* Vol. 201, 9-11 (2007), 5601-5606.
- [7] R.K. Roy, H.W. Choia, J.W. Yia, M.W. Moona, K.R. Leea, D.K. Hanb, J.H. Shinc, A. Kamijod, T. Hasebee: Hemocompatibility of surface-modified, silicon-incorporated, diamond-like carbon films. *Acta Biomaterialia* Vol. 5, 1 (2009) 249-256.
- [8] S. Mantero, D. Piuri, F. M. Montevecchi, S. Vesentini, F. Ganazzoli, G. Raffaini: Albumin adsorption onto pyrolytic carbon: A molecular mechanics. *Journal of Biomedical Materials Research*, Vol. 59, 2 (2002) 329-339.

## References

- [9] I.B. Leonor, R.L. Reis: An innovative auto-catalytic deposition route to produce calcium-phosphate coatings on polymeric biomaterials, *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, Vol. 14, 5 (2003) 435-441.
- [10] K. Kirchhof, K. Hristova, K. Kamelia; N. Krasteva, G. Altankov, T. Groth: Multilayer coatings on biomaterials for control of MG-63 osteoblast adhesion and growth. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, Vol. 20, 4 (2009) 897-907.
- [11] J.M. Lackner, W. Waldhauser: Diamond and Diamond-like Carbon Coated Surfaces as Biomaterials, *BHM Berg- und Hüttenmännische Monatshefte*, Vol. 155, 11 (2010) 528-533.
- [12] M. J. Papo, S.A. Catledge, Y. K. Vohra, C. Machado: Mechanical wear behavior of nanocrystalline and multilayer diamond coatings on temporomandibular joint implants. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, Vol. 15, 7 (2004) 773-777.
- [13] W. Kaczorowski, P. Niedzielski: Morphology and Growth Process of Carbon Films Prepared by Microwave / Radio Frequency Plasma Assisted CVD. *Advanced Engineering Materials*, Vol. 10, 7 (2008) 651-656.
- [14] Y. Kousar, N. Ali, V.F. Neto, Sen Mei, J. Gracio: Deposition of nanocrystalline diamond and titanium oxide coatings on pyrolytic carbon using CVD and sol-gel techniques. *Diamond and Related Materials* 13 (2004) 638-642.
- [15] E. Lopez-Honorato, P.J. Meadows, P. Xiao: Fluidized bed chemical vapor deposition of pyrolytic carbon – I. Effect of deposition conditions on microstructure. *Carbon* 47 (2009) 396-410.
- [16] P. Litzler, L. Benard, N. Barbier-Frebourg, S. Vilain, T. Jouenne, E. Beucher, C. Bunel, J. F. Lemeland, J.P. Bessou: Biofilm formation on pyrolytic carbon heart valves: Influence of surface free energy, roughness, and bacterial species. *The Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery*, Vol. 134, 4 (2007) 1025-1032.

# OCENA WŁASNOŚCI FIZYCZNYCH I BIOLOGICZNYCH SAMOORGANIZUJĄCEGO SIĘ BIOMATERIAŁU OTRZYMANEGO Z CHITOZANU/FOSFORANU WAPNIA/ALGINIANU DO ZASTOSOWAŃ STOMATOLOGICZNYCH

MARTYNA KUCHARSKA<sup>1\*</sup>, GRZEGORZ BUBAK<sup>1</sup>,  
MAGDALENA KOWALCZYK<sup>1</sup>, WITOLD BOJAR<sup>2</sup>, TOMASZ BRYNK<sup>3</sup>,  
ŁUKASZ KOPERSKI<sup>4</sup>, TOMASZ CIACH<sup>1</sup>

<sup>1</sup> LABORATORIUM INŻYNIERII BIOMEDYCZNEJ,  
WYDZIAŁ INŻYNIERII CHEMICZNEJ I PROCESOWEJ,  
POLITECHNIKA WARSZAWSKA

<sup>2</sup> ZAKŁAD WYROBÓW MEDYCZNYCH, NARODOWY INSTYTUT LEKÓW

<sup>3</sup> WYDZIAŁ INŻYNIERII MATERIAŁOWEJ, POLITECHNIKA WARSZAWSKA

<sup>4</sup> ZAKŁAD PATOMORFOLOGII, WARSZAWSKI UNIWERSYTET MEDYCZNY

\* E-MAIL: M.KUCHARSKA@ICHIP.PW.EDU.PL

## Streszczenie

Celem niniejszej pracy było zaprojektowanie i otrzymanie wstrzykiwalnego biomateriału o własnościach osteokondukcyjnych, który potencjalnie mógłby znaleźć zastosowanie w procesach augmentacji kości przed leczeniem implantologicznym z wykorzystaniem sterowanej regeneracji kości (GBR). W tym celu opracowano samoorganizujący się biomateriał otrzymany z granulatu chitozan/fosforan trójwapnia oraz soli sodowej kwasu alginowego (CH/TCP/Alg).

Opracowany materiał przebadano pod względem morfologii i mikrostruktury, zarówno granulatu, jak i uformowanych aglomeratów. Własności fizyczne, takie jak czas żelowania oraz wytrzymałość mechaniczna na ściskanie były przedmiotem niniejszych badań. Przeprowadzono także testy *in vivo* opracowanego biomateriału na modelu szczura. Dokonano oceny odpowiedzi modelu zwierzęcego na zaimplantowany biomateriał, a wyniki porównano z alloplastycznym materiałem komercyjnie dostępnym. Otrzymane wyniki wskazały, że opracowany wstrzykiwalny system spełnia wymagania pod kątem zastosowań w sterowanej regeneracji kości.

**Słowa kluczowe:** chitozan, alginian,  $\beta$ -fosforan trójwapnia, wstrzykiwalny system, sterowana regeneracja kości, badania *in vivo*, biomateriał

[Inżynieria Biomateriałów, 105, (2011), 20-24]

## Wprowadzenie

Sterowana regeneracja kości (GBR) jest techniką stomatologiczną, w której wykorzystuje się rozmaite materiały o potencjale kościotwórczym do regeneracji i augmentacji kości (np. rekonstrukcja wyrostka zębodołowego, sinus-lift – podnoszenie dna zatoki szczękowej). Terapia z wykorzystaniem GBR wymaga także zastosowania dodatkowej membrany, która uniemożliwia wzrost tkanek miękkich do regenerowanego miejsca. Celem badań było opracowanie formułacji wstrzykiwalnego biodegradowalnego materiału o potencjale kościotwórczym, który mógłby stanowić wsparcie dla wzrostu nowej tkanki kostnej.

# PHYSICAL AND BIOLOGICAL EVALUATION OF CHITOSAN/CALCIUM PHOSPHATE/ALGINATE SELF-SETTING BIOMATERIAL FOR DENTAL APPLICATIONS

MARTYNA KUCHARSKA<sup>1\*</sup>, GRZEGORZ BUBAK<sup>1</sup>,  
MAGDALENA KOWALCZYK<sup>1</sup>, WITOLD BOJAR<sup>2</sup>, TOMASZ BRYNK<sup>3</sup>,  
ŁUKASZ KOPERSKI<sup>4</sup>, TOMASZ CIACH<sup>1</sup>

<sup>1</sup> BIOMEDICAL ENGINEERING LABORATORY,  
FACULTY OF CHEMICAL AND PROCESS ENGINEERING,  
WARSAW UNIVERSITY OF TECHNOLOGY, POLAND

<sup>2</sup> MEDICAL DEVICES DEPARTMENT,  
NATIONAL MEDICINES INSTITUTE, POLAND

<sup>3</sup> FACULTY OF MATERIALS SCIENCE AND ENGINEERING,  
WARSAW UNIVERSITY OF TECHNOLOGY, POLAND

<sup>4</sup> DEPARTMENT OF PATHOLOGY,  
MEDICAL UNIVERSITY OF WARSAW, POLAND

\* E-MAIL: M.KUCHARSKA@ICHIP.PW.EDU.PL

## Abstract

The main objective of the work was to design and fabricate an injectable biomaterial with osteoconductive properties for bone augmentation and potential to be used in dental applications in peri-implant therapy concerning guided bone regeneration. For this purpose, a self-setting biomaterial consisting of chitosan/tricalcium phosphate microparticles and sodium alginate was formulated (CH/TCP/Alg).

The obtained material was characterized as far as microsphere and formed agglomerates morphology and microstructure. Physical properties relating to setting time and mechanical properties were also investigated. Finally, *in vivo* response to implanted biomaterial was studied on rat model and compared with commercially available alloplastic material. The obtained results showed that designed injectable biomaterial fulfilled main requirements for guided bone regeneration application.

**Keywords:** chitosan, alginate,  $\beta$ -tricalcium phosphate, injectable systems, guided bone regeneration, *in vivo* studies, biomaterial

[Engineering of Biomaterials, 105, (2011), 20-24]

## Introduction

Guided bone regeneration (GBR) is a dental technique utilizing various materials for missing bone regeneration (for example ridge reconstruction, sinus-lift procedure). The therapy requires also using an additional membrane acting as a barrier preventing soft tissue ingrowth into regenerated area. The goal of presented work was to develop formulation of injectable, biodegradable material acting as a bone substitute that could support new bone tissue ingrowth. The fabricated biomaterial was based on chitosan, which has been widely discussed so far as far as its application in bone tissue engineering [1-3]. Evaluation of physical and biological properties relating to designed self-setting biomaterial is discussed herein.

Podstawowym materiałem do wytwarzania rusztowań był chitozan, którego zastosowanie w inżynierii tkanki kostnej było do tej pory szeroko omawiane [1-3]. W niniejszej pracy przedstawiono ocenę własności fizycznych oraz biologicznych otrzymanego samoorganizującego się biomateriału.

Biomateriał tworzący w oparciu o układ dwufazowy, w skład którego wchodzi: faza stała – granulaty chitozan (CH)/ $\beta$ -fosforan trójwapienia (TCP) oraz faza płynna – 2% roztwór soli kwasu alginowego [4,5]. Formowanie układu wstrzykiwalnego polegało na uwalnianiu jonów wapnia z granulek CH/TCP do płynnej fazy alginianowej, która podlega żelowaniu w obecności uwolnionych jonów.

## Materiały i Metody

Do otrzymywania rusztowań wykorzystano chitozan o 95% stopniu deacetylacji [1,6], który pozyskano z Medical Heppe GmbH (Niemcy).  $\beta$ -fosforan trójwapienia oraz sól sodową kwasu alginowego zakupiono w Sigma Aldrich.

Granulki CH/TCP otrzymano na drodze hydrodynamicznego formowania kropli zawiesiny, które były wkraplane do kąpielii precypitującej stanowiącej wodny roztwór NaOH. Zawiesinę CH/TCP uzyskano poprzez dyspersję sproszkowanego TCP w 2% roztworze chitozanu w 2% kwasie octowym. Homogeniczną zawiesinę umieszczano w 50 ml strzykawkach (BD Perfusion), a następnie przetłaczano przez plastikowe dysze z wykorzystaniem pompy infuzyjnej (AP22, Ascor) do mieszającej się kąpielii 2% roztworu NaOH (rpm=800). Następnie uformowane krople płukano wodą destylowaną, odwadniano 96% alkoholem etylowym oraz poddawano suszeniu w temperaturze pokojowej. Suchy granulaty poddawano nasączeniu w roztworze  $\text{CaCl}_2$  w celu wprowadzenia jonów  $\text{Ca}^{2+}$  odpowiedzialnych za sieciowanie alginianu i formowanie struktury 3D biomateriału po połączeniu z granulatkami CH/TCP. Materiał formowano poprzez połączenie granulek z roztworem alginianu w stosunku wagowym 1:2. W zaprezentowanej pracy przedstawiono badanie wpływu stężenia  $\text{CaCl}_2$  oraz czasu immersji fazy stałej w roztworze jonów  $\text{Ca}^{2+}$  na szybkość żelowania materiału.

Ocenę morfologii kompozytowego granulatu oraz uformowanego materiału dokonano technikami mikroskopowymi (mikroskop optyczny - Nikon Eclipse 80i oraz mikroskop elektronowy, Zeiss Supra). Czas żelowania oszacowano wykorzystując strzykawkę wyposażoną w dwa tłoki (RYS. 1). Badanie polegało na przetłaczaniu płynnej fazy alginianu przez granulki umieszczone wewnątrz strzykawki. Układ uznawano za żelowany, gdy wzrastający opór przepływu płynu przez warstwę granulek uwalniających jony wapnia powodował gęstnienie alginianu i jednocześnie uniemożliwiał transport płynu przez granulaty. Czas żelowania mierzono stoperem. W celu przeprowadzenia badania do strzykawki wprowadzano 1,00 g granulek oraz 2 ml roztworu alginianu. Eksperymentalnie przebadano wpływ stężenia chlorku wapnia (1, 2, 10%) oraz czasu immersji granulek w roztworze (15 min, 24 h) na czas żelowania materiału.

The presented material was designed as a biphasic system, where solid phase was consisting of chitosan (CH)/ $\beta$ -tri-calcium phosphate (TCP) particles and a liquid one constituted of 2% solution of alginate salt [4,5]. The injectable system formation relied on calcium ions release from chitosan/TCP particles into liquid alginic phase that tends to form gel in presence of calcium ions.

## Materials and Methods

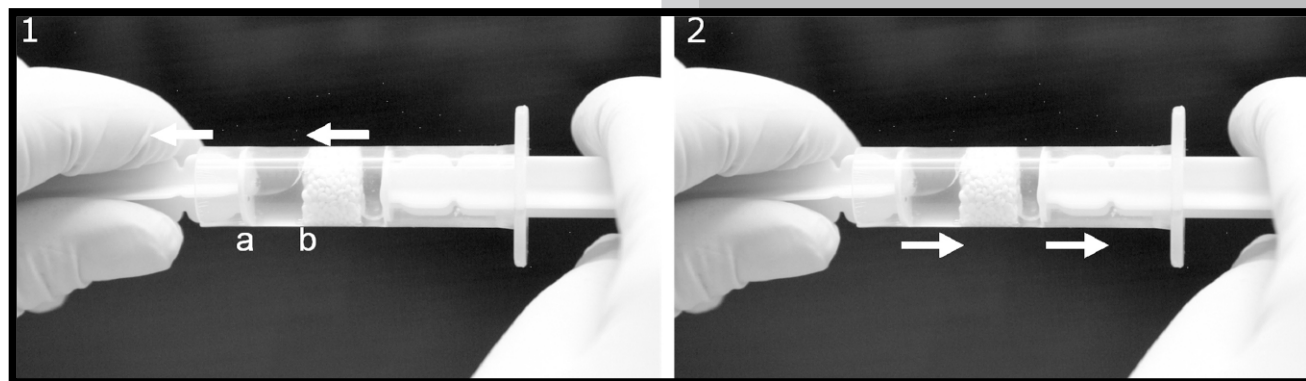
Chitosan (~95% degree of deacetylation) [1,6] was purchased from Medical Heppe GmbH,  $\beta$ -tri-calcium phosphate from Sigma Aldrich and alginic acid sodium salt from brown algae was purchased from Fluka.

Chitosan/  $\beta$ -tri-calcium phosphate beads were prepared by hydrodynamic formulation of CH/TCP solution in drop forming rate and were being collected into precipitation bath consisting of NaOH solution. Chitosan/  $\beta$ -TCP solution was prepared by suspending TCP powder in 2% chitosan in 2% acetic acid solution. The homogenous suspension was being placed in 50 ml syringe (BD Perfusion) and pressed out through the plastic nozzle using infusion pump (AP22, Ascor) into continuously stirring (rpm=800) 2% NaOH bath. Afterwards, the formulated beads were washed with distilled water and dehydrated with the use of 96% ethanol. In the next step, the granules were dried at room temperature.

Dried microspheres were immersed in  $\text{CaCl}_2$  solution in order to enrich CH/TCP beads with  $\text{Ca}^{2+}$  ions, so that the inorganic phase could constitute a carrier and source of cross-linking agent release for alginate gel formation. The injectable system was obtained by mixing CH/TCP beads with the liquid alginate in the following mass ratio 1:2. Calcium chloride concentration and immersion time were considered and studied in the hereby presented studies.

The morphological evaluation of composite CH/TCP particles and formed injectable system were performed by optical microscope Nikon Eclipse 80i and SEM analysis (Zeiss Supra). The gelling time of injectable system was evaluated with the use of double plunger syringe (FIG. 1). In order to determine the setting time liquid alginic phase was forced through the composite granule phase which was previously placed in the syringe. The system was assumed as gelled when resistance of the liquid phase flow increased preventing alginate transport through the beads and was measured as setting time with the use of timer. To conduct investigation 1.00 g of composite granules were placed into syringe and 2 ml of alginic acid sodium salt was added. Both the influence of calcium chloride concentration (1, 2, 10%) and time of soaking CH/TCP phase in the solution of calcium chloride were evaluated during the study.

**RYS. 1. Badanie czasu żelowania; a - faza płynna (alginian), b - faza stała (granulaty CH/TCP). FIG. 1. Setting time evaluation; a - liquid phase, b - solid phase (beads).**





Własności mechaniczne przebadano dokonując próby ściskania biomateriałów uformowanych w kształcie cylindrów. Przetestowano dwie generacje próbek: materiały uformowane, a następnie wysuszone ( $n=6$ ) oraz materiały zwilżone alginianem, które poddano analizie natychmiast po ich uformowaniu ( $n=6$ ). Badania przeprowadzono na uniwersalnym elektromechanicznym stanowisku MTS Q/test 10 (parametry pracy: obciążenie 10 kN, szybkość przesuwu tłoka 0,1 mm/s). Wartości modułu Younga zostały wyznaczone na podstawie kąta nachylenia odcinka prostoliniowego krzywych naprężenia-odkształcenie, a wytrzymałość na ściskanie określono jako pierwsze maksimum widoczne na krzywych.

Przeprowadzono także wstępne badania *in vivo* na modelu szczura opracowanych biomateriałów oraz materiału alloplastycznego dostępnego komercyjnie (granulat TCP/PLA) jako próbę kontrolną. Biomateriały implantowano do eksperymentalnie utworzonych defektów o średnicy 7 mm w czaszkach szczurów. Badaniu poddano 40 zwierząt, a analizę histologiczną przeprowadzono po 4 i 12 tygodniach dla obu grup materiałów.

## Wyniki i dyskusja

Granulat otrzymany na drodze hydrodynamicznego formowania przedstawiono na RYS. 2a,b,c. Ze względu na obecność nieorganicznej fazy fosforanowo-wapniowej powierzchnia cząstek jest chropowata i posiada dobrze rozwiniętą mikrostrukturę, co można stwierdzić na podstawie mikrofotografii uzyskanych przy pomocy SEM (RYS. 2c). Materiał wstrzykiwalny CH/TCP/Alg uformowany w postaci krążków, uprzednio wysuszony poddano obserwacjom w mikroskopie elektronowym (RYS. 2d,e,f). Warstwa alginianu pokrywająca granulat CH/TCP posiada gładką powierzchnię, która ma skłonność do pęknięcia ze względu na znaczną utratę wody w wyniku procesów suszenia. RYS. 2g,h,i prezentuje uformowany biomateriał z uwodnioną warstwą alginianu, obserwowany w mikroskopie optycznym. Od lewej odpowiednio, morfologia granulek CH/TCP (RYS. 2g) oraz uformowany CH/TCP/Alg biomateriał (RYS. 2h,i). Przeprowadzone badania dotyczące czasu żelowania materiału wykazały, że czas immersji w roztworze chlorku wapnia nie wpływał znacząco na szybkość formowania struktury, natomiast wraz z rosnącym stężeniem jonów wapnia obserwowano krótsze czasy żelowania (RYS. 3).

Mechanical properties concerning compression tests were studied on cylindrical shape samples. There were two generations of the biomaterials tested; the specimens, which were previously dried in the room temperature for 24 h ( $n=6$ ) and samples which were tested in their "wet" form, immediately after material formation ( $n=6$ ). The universal electromechanical testing set-up MTS Q/test 10 with work parameters: load 10 kN and constant speed of crosshead displacement 0.1 mm/s was used. Young modulus values were calculated from the slope of linear part of stress-strain curves and compressive strength was obtained from the first maximum of stress visible in the curves.

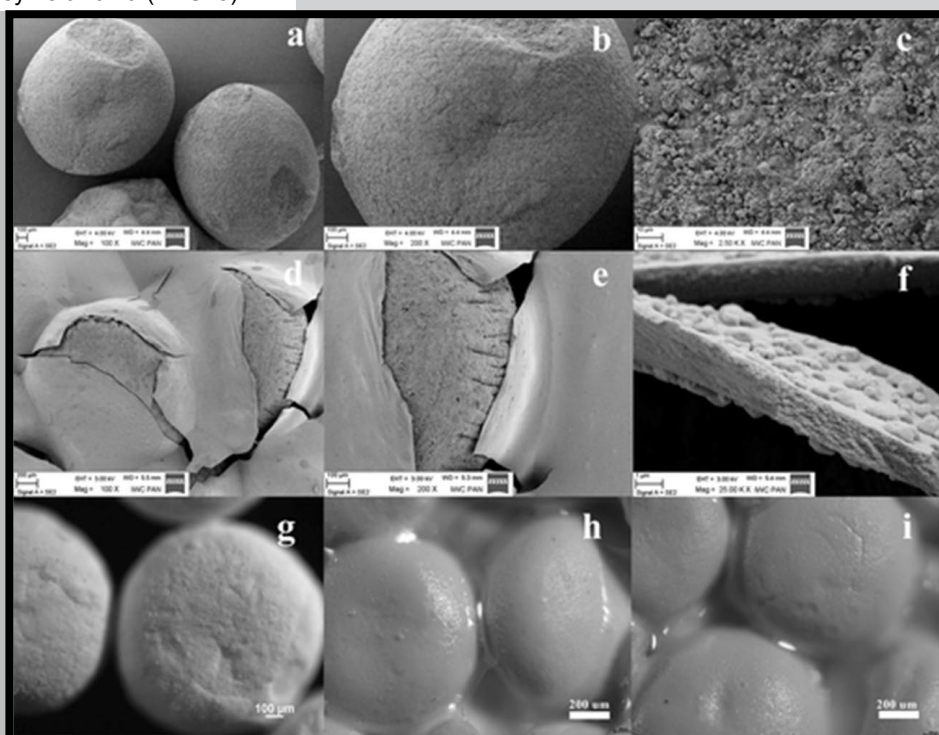
Preliminary studies concerning *in vivo* response to implanted biomaterial were conducted on the rat model. Both CH/TCP/Alg biomaterial and commercial product based on TCP microparticles were implanted into experimentally created critical-size (7 mm) defects in rats' skull. There were 40 rats subjected to the surgical procedure. Histological evaluation after implantation was conducted after 4 and 12 weeks.

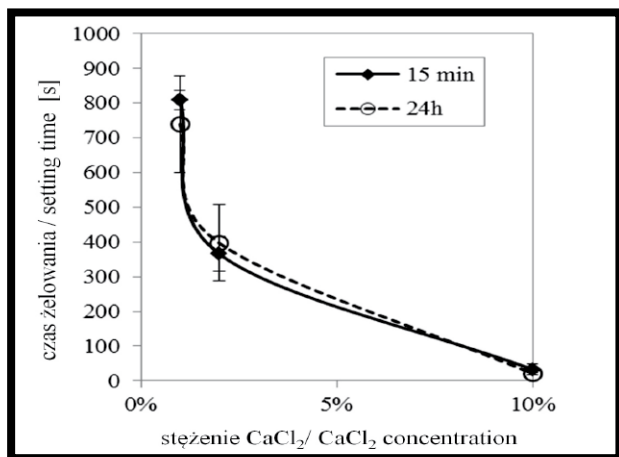
## Results and Discussion

Particles obtained by drop forming method are shown in the FIG. 2a,b,c. Due to incorporated inorganic calcium phosphate phase they possess rough surface with well-developed microstructure, what can be found by considering SEM microphotographs presented in FIG. 2c. Formed into cylindrical shape, previously dried, CH/TCP/Alg biomaterial was also analyzed by SEM and the pictures obtained are presented in the FIG. 2d,e,f. When compared with CH/TCP beads, alginic layer seems to possess smooth surface that tends to be fractured when material completely dried. FIG. 2g,h,i present photographs obtained by optical microscope. From the left hand side, respectively, morphology of CH/TCP microspheres (g) and formed injectable system covered with the layer of alginate gel (h, i). It was found that immersion time in  $\text{CaCl}_2$  did not influence setting time of the system, but on the other hand we have established that increasing concentration of cross-linker significantly diminished the time of material gelation (FIG. 3).

**RYS. 2. Morfologia i topografia granulatu CH/TCP, zdjęcia uzyskane z wykorzystaniem SEM (a,b,c); mikrofotografie uformowanego biomateriału CH/TCP/Alg (d,e,f); morfologia CH/TCP/Alg, mikroskop optyczny (g,h,i).**

**FIG. 2. Morphology and topography of CH/TCP particles obtained by SEM analysis (a,b,c); microphotograph of formed CH/TCP/Alg biomaterial (d,e,f); morphology of biomaterial observed by optical microscope (g,h,i).**





**RYS. 3. Wpływ stężenia chlorku wapnia (1, 2, 10%) oraz czasu immersji (15 min, 24 h) na szybkość żelowania biomateriału.**

**FIG. 3. Effect of calcium chloride concentrations (1, 2, 10%) and immersion times (15 min, 24 h) on the setting time of injectable system.**

Badaniu poddano dwie generacje materiałów uformowanych w kształcie cylindrów. Zarówno próbki uprzednio wysuszone, jak i świeżo uformowane, zwilżone hydrożelem alginianowym przeanalizowano podczas próby ściskania. Wyniki badań przedstawiono na RYS. 4. Materiały uprzednio suszone wykazywały bardziej sztywną strukturę ze względu na utratę elastyczności w wyniku odwodnienia hydrożelu alginianowego. Moduł Younga dla materiałów suchych osiągał wartości  $16,19 \pm 2,35$  MPa, a wytrzymałość na ściskanie wynosiła  $1,97 \pm 0,77$  MPa. W przypadku materiałów z żelem alginianowym zarówno moduł elastyczności, jak i wytrzymałość na ściskanie osiągały niższe wartości, odpowiednio  $9,54 \pm 0,62$  MPa i  $0,94 \pm 0,07$  MPa.

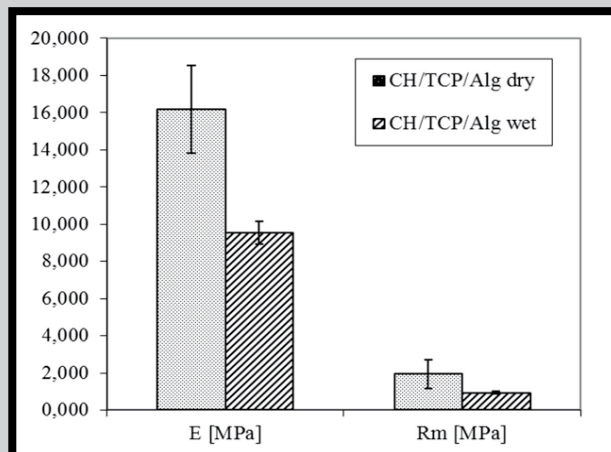
Analiza histologiczna przeprowadzona po 4 i 12 tygodniach od implantacji wykazała, iż w obu punktach czasowych obserwowano ogniska kościotworzenia wokół opracowanego samoorganizującego się biomateriału (RYS. 5a,c,e). Dla porównania, w przypadku materiału komercyjnie dostępnego odnotowano odpowiedź zapalną oraz brak aktywności osteokondukcyjnej wszczepu po 4 tygodniach i znikome ogniska kościotworzenia po 3 miesiącach (RYS. 5b,d,f).

## Wnioski

W niniejszej pracy zaproponowano formułację samoorganizującego się biomateriału otrzymanego z chitozanu, fosforanu wapnia oraz soli kwasu alginowego. Materiał przebadano pod względem morfologii, przeprowadzono analizę czasu żelowania w zależności od stężeń oraz czasu immersji granulat i wykazano istotny wpływ stężenia jonów wapnia na szybkość żelowania. Dokonano oceny własności mechanicznych materiału w zależności od uwodnienia alginianu. Wstępne badania *in vivo* przeprowadzone na modelu szczura wykazały efekt kościotworzenia, co pozwala pomyślnie wnioskować o potencjalnym zastosowaniu biomateriału do zastosowań w augmentacji kości.

## Podziękowania

Niniejsza praca jest finansowana przez Fundację na Rzecz Nauki Polskiej w ramach Programu Operacyjnego Innowacyjna Gospodarka.



**RYS. 4. Własności mechaniczne; E – moduł Young'a,**

**Rm – wytrzymałość na ściskanie.**

**FIG. 4. Mechanical properties;**

**E – Young's modulus,**

**Rm – compressive strength.**

Two generations of the cylinder-shaped biomaterials were tested in order to evaluate mechanical properties of injectable system. Both dried samples and newly formed scaffolds wetted by alginic layer were subjected to the study. It was clearly found that "dry" specimens tend to possess stiffer architecture due to dried alginic phase covering beads surfaces, which lost its gel-like elastic structure during drying process. Young's modulus for "dry" materials reached out  $16,19 \pm 2,35$  MPa and the compressive strength amounted to  $1,97 \pm 0,77$  MPa. In the case of "wet" samples both elastic modulus and compressive strength obtained possessed lower values and reached out  $9,54 \pm 0,62$  MPa and  $0,94 \pm 0,07$  MPa, respectively.

*In vivo* studies on rat model revealed that after a month and three months from implantation there was newly formed bone observed around biomaterial. In comparison commercially available alloplastic material did not exhibit similar osteoconductive properties and revealed high inflammatory response without osteogenic activity (FIG. 5).

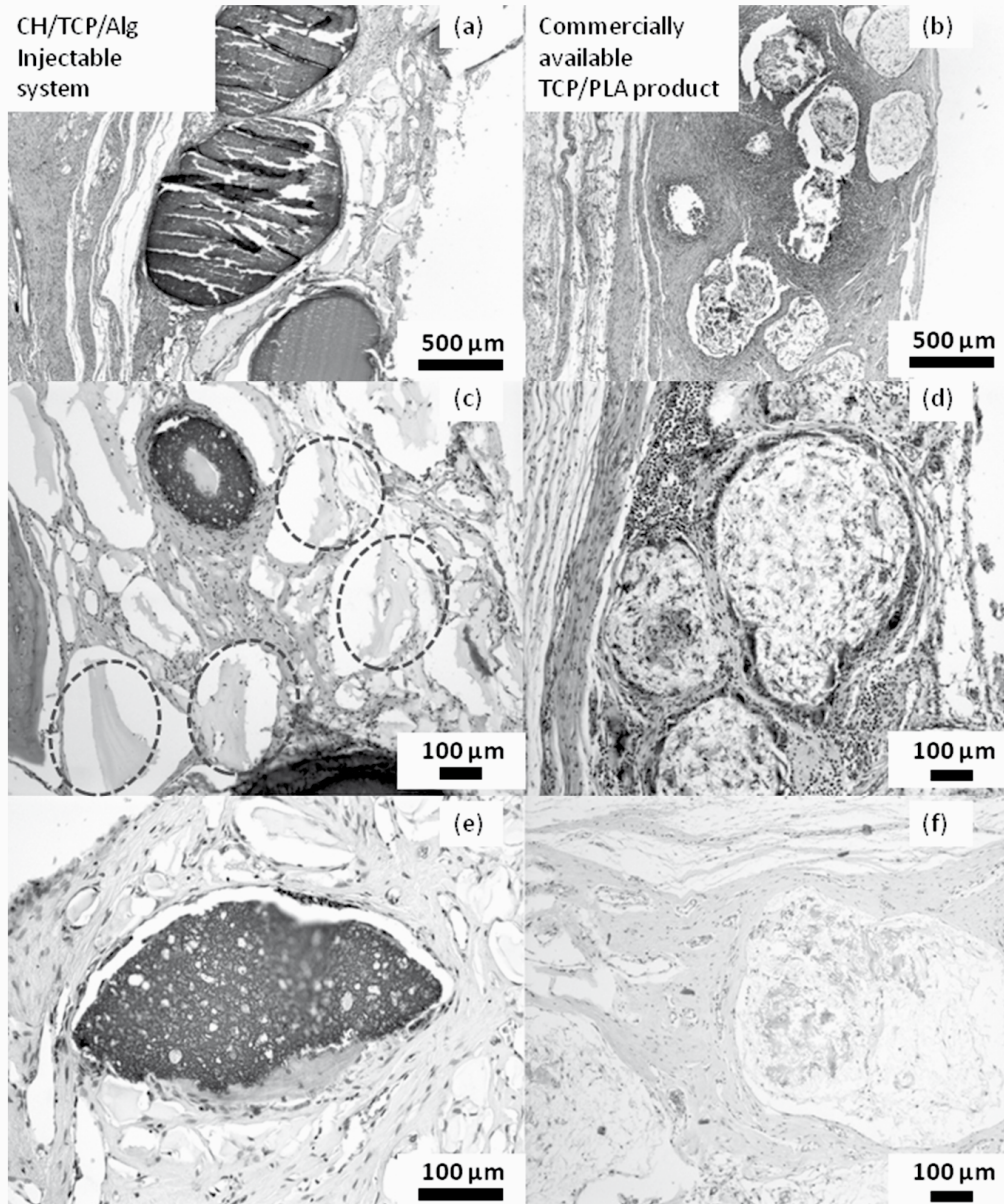
## Conclusions

In the hereby presented work formulation of self-setting biomaterial obtained from chitosan, calcium phosphate and alginate salt was proposed. The biomaterial was characterized as far as morphology evaluation, self-setting time with respect to calcium ions concentration and immersion time in the cross-linker solution. Mechanical properties were analyzed for dried and wetted biomaterials. Preliminary *in vivo* studies revealed osteogenic effect of formulated biomaterial, what might state about potential application for bone augmentation.

## Acknowledgements

This work was financially supported by Foundation of Polish Science in the frame of Innovative Economy Operational Programme.





**RYS. 5.** Analiza histologiczna po 4 i 12 tygodniach od implantacji biomateriału; a, c, e – wstrzykiwalny system CH/TCP/Alg; b, d, f – komercyjnie dostępny materiał aloplastyczny (TCP/PLA); c – ogniska kościotworzenia wokół opracowanego biomateriału, oznaczone kółkami; d – brak kościotworzenia wokół materiału komercyjnie dostępnego, obserwowano odczyn zapalny po 4 tygodniach od implantacji; e, f – badania po 12 tygodniach; e – uwapniona tkanka kostna wrastająca na powierzchnię materiału, f – niewielki efekt kościotworzenia dla materiału TCP/PLA

**FIG. 5.** Histological evaluation after 4 and 12 weeks from biomaterials implantation; a, c, e – CH/TCP/Alg injectable system, b, d, f – commercially available alloplastic material (TCP/PLA), respectively. (c) newly formed bone tissue around fabricated biomaterial observed after 4 weeks, sites marked by circles (d) lack of bone formation in the case of commercial product, inflammatory response, after 4 weeks; e, f – results obtained after 12 weeks, (e) newly formed, calcified bone tissue growing onto material surface, (f) slight bone formation around commercial material.

## Piśmiennictwo

- [1] Hsu S., Whu S. W., Tsai C. L., Wu Y. H., Chen H. W., Hsieh K. H.: Chitosan as Scaffold Materials: Effects of Molecular Weight and Degree of Deacetylation. *Journal of Polymer Research* 11 (2) (2004) 141-147.
- [2] Khor E., Lim L. Y.: Implantable applications of chitin and chitosan. *Biomaterials* 24 (13), (2003) 2339-2349.
- [3] Kim I. Y., Seo S. J., Moon H. S., Yoo M. K., Park I. Y., Kim B. C., Cho C. S.: Chitosan and its derivatives for tissue engineering applications. *Biotechnology Advances* 26 (1), (2008) 1-21.

## References

- [4] Augst A.D., Kong H.J., Mooney D.J.: Alginate Hydrogels as Biomaterials. *Macromolecular Bioscience* (2006) 623-633.
- [5] Zhensheng L., Hassna R. Ramaya, Kip D. Hauchb, Demin Xiaoc and Miqin Zhanga: Chitosan-alginate hybrid scaffolds for bone tissue engineering. *Biomaterials* 26 (18), (2005) 3919-1928.
- [6] Ravi Kumar M.N.V., Muzzarelli R.A.A., et al.: Chitosan chemistry and pharmaceutical perspectives. *Chemical Review*, (2004) 104, 12:6017-6084.



# BIORESORBOWALNE KOPOLIMERY L-LAKTYDU I WĘGLANU TRIMETYLENU W KONTROLOWANYM UWALNIANIU PAKLITAKSLEU

MONIKA MUSIAŁ-KULIK<sup>1,2\*</sup>, JANUSZ KASPERCZYK<sup>1,2</sup>,  
MAŁGORZATA PASTUSIAK<sup>2</sup>, KATARZYNA GĘBAROWSKA<sup>2</sup>,  
HENRYK JANECEK<sup>2</sup>, MARCIN LIBERA<sup>2</sup>, MONIKA ZAJĄC<sup>1</sup>

<sup>1</sup> KATEDRA I ZAKŁAD BIOFARMACJI,  
ŚLĄSKI UNIWERSYTET MEDYCZNY,  
UL. NARCYZÓW 1, 41-200 SOSNOWIEC, POLSKA

<sup>2</sup> CENTRUM MATERIAŁÓW POLIMEROWYCH I WĘGLOWYCH,  
POLSKA AKADEMIA NAUK,  
UL. M. SKŁODOWSKIEJ-CURIE 34, 41-819 ZABRZE, POLSKA

\* E-MAIL: MUSIAL-KULIK@O2.PL

## Streszczenie

Skład komonomerów jak również mikrostruktura łańcucha polimerowego są ważnymi czynnikami determinującymi sposób degradacji polimeru oraz profil uwalniania leku. Celem badań było określenie wpływu mikrostruktury łańcucha na uwalnianie paklitakselu. Dwa rodzaje PLATMC (70:30) zostały użyte do przygotowania matryc z 3% i 5% zawartością leku oraz matryc bez leku. Materiały zostały zsyntezowane w różnych temperaturach i dlatego różniły się pod względem właściwości fizykochemicznych. Wszystkie matryce badano za pomocą spektroskopii NMR, GPC, DSC, SEM zarówno przed jak i w czasie procesu degradacji. Ilość uwolnionego paklitakselu szacowano przy pomocy HPLC. Otrzymane wyniki wskazują, iż podczas inkubacji w mikrostrukturze łańcucha kopolimerowego nie zaszły znaczące zmiany. Wolniejszy profil uwalniania odnotowano w przypadku PLATMC o wyższym współczynniku randomizacji, zsyntezowanego w wyższej temperaturze. Kopolimer ten wydaje się być atrakcyjnym materiałem do tworzenia systemów kontrolowanego uwalniania paklitakselu.

**Słowa kluczowe:** poli(L-laktyd-ko-węglan trimetylenowy), paklitaksel, restenoza, degradacja hydrolytyczna

[Inżynieria Biomateriałów, 105, (2011), 25-28]

## Wprowadzenie

Bioresorbowalne polimery stanowią materiały, które w ludzkim organizmie ulegają degradacji do nietoksycznych produktów. Najbardziej popularne i najbardziej użyteczne są homopolimery i kopolimery otrzymane na bazie laktydu, glikolidu,  $\epsilon$ -kapolaktanu i węglanu trimetylenowego. Materiały te różnią się pod względem stopnia krystaliczności, rozpuszczalności w rozpuszczalnikach organicznych, czasu i mechanizmu degradacji itd. [1,2]. Dlatego też, zmiany w składzie komonomerów, ich stosunku molowym, ale również w warunkach prowadzenia syntezy (np. temperatury, czasu reakcji, stosunku inicjatora do monomerów) pozwalają uzyskać biomateriały o pożądanych właściwościach.

Polimery mogą służyć jako nośniki leków i dzięki temu być wykorzystywane w medycynie i farmacji. Najważniejszą funkcją takich systemów jest uwalnianie w określonym czasie takiej ilości leku, aby zapewnione było odpowiednie jego stężenie w tkance docelowej [3].

# BIORESORBABLE COPOLYMERS OF L-LACTIDE AND TRIMETHYLENE CARBONATE FOR CONTROLLED DELIVERY OF PACLITAXEL

MONIKA MUSIAŁ-KULIK<sup>1,2\*</sup>, JANUSZ KASPERCZYK<sup>1,2</sup>,  
MAŁGORZATA PASTUSIAK<sup>2</sup>, KATARZYNA GĘBAROWSKA<sup>2</sup>,  
HENRYK JANECEK<sup>2</sup>, MARCIN LIBERA<sup>2</sup>, MONIKA ZAJĄC<sup>1</sup>

<sup>1</sup> DEPARTMENT OF BIOPHARMACY,  
MEDICAL UNIVERSITY OF SILESIA,  
NARCYZÓW 1 ST., 41-200 SOSNOWIEC, POLAND

<sup>2</sup> CENTRE OF POLYMER AND CARBON MATERIALS,  
POLISH ACADEMY OF SCIENCES,  
CURIE-SKŁODOWSKA 34 ST., 41-819 ZABRZE, POLAND

\* E-MAIL: MUSIAL-KULIK@O2.PL

## Abstract

Comonomers composition as well as the chain microstructure are very important factors determining time of polymer degradation and drug release profile. In this study it was aimed to determine the influence of chain microstructure on paclitaxel release. Two types of PLATMC (70:30) were used to prepare matrices with 3% and 5% of drug and also drug free matrices. They were synthesised at different temperature and thus differed in physicochemical properties. All of the matrices were investigated before and during hydrolytic degradation process by means of NMR spectroscopy, GPC, DSC, SEM. The amount of liberated paclitaxel was assessed with the use of HPLC. The obtained results indicated no significant changes in chain microstructure during incubation period of time. Slower release profile was noticed for PLATMC synthesised at higher temperature and possessed higher randomisation ratio. This type of copolymer seems to be very attractive candidate for controlled paclitaxel delivery systems.

**Keywords:** poly(L-lactide-co-trimethylene carbonate), paclitaxel, restenosis, hydrolytic degradation

[Engineering of Biomaterials, 105 (2011), 25-28]

## Introduction

Bioresorbable polymers constitute materials that degrade to non-toxic products. The most popular and the most useful are homopolymers and copolymers based on lactide, glycolide,  $\epsilon$ -caprolactone and trimethylene carbonate (TMC). These materials differ in crystallinity, solubility in organic solvents, hydrophobicity, time and mechanism of degradation, etc. [1,2]. Therefore, changes in comonomers composition, their molar ratio but also synthesis conditions (e.g. temperature, time of reaction, initiator to monomer ratio) allow to obtain biomaterial with desirable properties.

Polymers may serve as vehicles for drug delivery and thus can be used in medicine and pharmacy. The most important function of such systems is to release appropriate amount of drug during known period of time, which provide suitable concentration for targeted tissue [3].

Paklitaksel (PTX) jest znany jako jeden z antyproliferycyjnych i immunosupresyjnych terapeutów, jednak ma on także właściwości antyrestenotyczne [4]. Lek ten redukuje proliferację komórek mięśni gładkich i przez to ogranicza wzrost neointymy – głównej przyczyny restenozy w stencie [5].

Polimerowe systemy uwalniania paklitakselu mogą służyć jako bioresorbowalne stenty lub ich pokrycia. Całkowicie bioresorbowalne stenty są niedostępne na rynku komercyjnym, a więc implanty uwalniające lek antyrestenotyczny wydają się być bardzo atrakcyjnym rozwiązaniem.

## Materials and methods

Kopolimery zostały zsyntezowane na bazie L-laktydu i węglanu trimetyleny w Centrum Materiałów Polimerowych i Węglowych, PAN w Zabrzu z użyciem acetyloacetonianu cyrkonu (IV) jako niskotoksycznego inicjatora [6]. Kopolimeryzacja w masie była prowadzona w 150°C (POL1) oraz w 120°C (POL2), stosunek inicjatora do monomerów (I/M) wynosił 1/1100.

Dwa rodzaje kopolimerów poli(L-laktydu-ko-węglanu trimetyleny) (70:30) zostały użyte do przygotowania matryc z 3%, 5% zawartością paklitakselu oraz matryc bez leku. 10 mm matryce inkubowano pojedynczo w 37°C w obecności buforu fosforanowego (PBS, pH 7,4), jako wzorca płynów biologicznych. Medium było wymieniane każdego tygodnia i przechowywane do analiz HPLC. W określonych odstępach czasowych jedna matryca każdego typu była wyłączana z doświadczenia, płukana i osuszona przed analizą.

Widma  $^1\text{H}$  i  $^{13}\text{C}$  zostały zarejestrowane za pomocą spektroskopu NMR (AVANCE II Ultra Shield Plus, 600 MHz, Bruker) w celu określenia składu komonomerów i mikrostruktury łańcucha polimerowego.

Liczbowa średnia masa cząsteczkowa oraz współczynnik polidispersyjności (D) oznaczono z użyciem (D) chromatografu żelowego (GPC, Physics SP 8800 chromatograph).

Temperatura zeszklenia  $T_g$ , temperatura topnienia  $T_m$  oraz entalpia topnienia  $\Delta H_m$  były wyznaczone przy użyciu skaningowego kalorymetru różnicowego (DSC, TA DSC 2010, TA Instruments, New Castle, DE). Matryce ogrzewano w zakresie temperatur od -50°C do 200°C z szybkością 20°C/min.

Wysokosprawna chromatografia cieczowa (VWR-Hitachi LaChrom Elite®) posłużyła do oszacowania ilości paklitakselu uwolnionego do PBS. Pomiary prowadzono na kolumnie LiChrospher® RP-18 (250 x 4 mm, 5  $\mu\text{m}$ ) w obecności prekolumny LiChrospher® RP-18 (4 x 4 mm, 5  $\mu\text{m}$ ). Faza ruchoma składała się z mieszaniny acetonitrylu i wody (60:40), jej przepływ wynosił 1 ml/min. Paklitaksel monitorowano przy długości fali równej 227 nm, docetaksel służył jako standard wewnętrzny.

Morfologia powierzchni matryc była obserwowana za pomocą skaningowego mikroskopu elektronowego (SEM, Quanta 250 FEG, FEI Company, USA). Analizę prowadzono w warunkach niskiej próżni po uprzednim napyleniu matryc warstwą złota w celu zminimalizowania ładunku powierzchniowego.

## Wyniki i dyskusja

Celem badania było określenie wpływu mikrostruktury PLATMC na profil uwalniania paklitakselu.

Dwa rodzaje PLATMC (70:30) zostały wykorzystane do przygotowania matryc z paklitaksem i matryc niezawierających leku: POL1 (zsyntezowany w 150°C) i POL2 (120°C) (TABELA 1). Użyte w doświadczeniu polimery posiadały taki sam skład komonomerów, oba cechowały się bezładnością łańcucha polimerowego. Współczynnik bezładności wynosił 0,91 w przypadku POL1 oraz 0,64 dla POL2.

Paclitaxel (PTX) is known as one of the anti-proliferative and immunosuppressive drug but has also anti-restenotic properties [4]. It reduces smooth muscle cells (SMCs) proliferation and thus limits neointimal growth - the major cause of in-stent restenosis [5].

Polymeric delivery systems of paclitaxel may serve as bioresorbable stents or stent coatings. Fully bioresorbable stents are still commercially unavailable and hence polymer devices releasing antirestenotic drug seem to be a very attractive solution.

## Materials and methods

Copolymers were synthesized from L-lactide and trimethylene carbonate at the Centre of Polymer and Carbon Materials, PAScs in Zabrze with the use of zirconium (IV) acetylacetonate as a low-toxicity initiator [6]. Copolymerization was performed in bulk at 150°C (POL1) or 120°C (POL2) and the initiator to monomer ratio (I/M) averaged 1/1100.

Two copolymers of poly(L-lactide-co-trimethylene carbonate) (PLATMC) (70:30) were used to prepare matrices containing 3%, 5% of paclitaxel and also drug free matrices. 10 mm matrices were incubated separately at 37°C in the presence of phosphate buffered saline (PBS, pH 7.4) as the model of biological fluids. Medium was refreshed every week and collected for HPLC analysis. At selected time points each type of matrix was withdrawn, washed and dried before the study.

NMR spectroscopy (AVANCE II Ultra Shield Plus, 600 MHz, Bruker) was employed to record  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  spectra of copolymers in order to characterise comonomers composition and chain microstructure.

The number average molecular weight and ( $M_n$ ) and molecular mass dispersity (D) were defined with the use of gel permeation chromatograph (GPC, Physics SP 8800 chromatograph).

The glass-transition temperature, melting temperature and melting enthalpy ( $T_g$ ,  $T_m$  and  $\Delta H_m$  respectively) were determined by means of differential scanning calorimetry (DSC, TA DSC 2010, TA Instruments, New Castle, DE). The matrices were heated from -50°C to 200°C at a rate of 20°C/min.

High-performance liquid chromatography (VWR-Hitachi LaChrom Elite®) was used to assess amount of paclitaxel released into PBS. Measurements were carried out with the use of LiChrospher® RP-18 column (250 x 4 mm, 5  $\mu\text{m}$ ) and guard column LiChrospher® RP-18 column (4 x 4 mm, 5  $\mu\text{m}$ ). The mobile phase was composed of acetonitrile and water (60:40), and the flow rate was 1 ml/min. Paclitaxel was monitored with a UV detector at 227 nm, docetaksel served as internal standard.

Surface morphology of matrices was observed using scanning electron microscope (SEM, Quanta 250 FEG, FEI Company, USA). The matrices were analysed at low vacuum after being coated with gold to minimise surface charge.

## Results and Discussions

The aim of this study was to determine the influence of PLATMC chain microstructure on paclitaxel release profile.

Two types of PLATMC (70:30) were used to prepare matrices with paclitaxel and drug free matrices: POL1 (synthesised at 150°C) and POL2 (120°C) (TABLE 1). Both polymers used in experiment had the same comonomer ratio and possessed random structure. The randomisation ratios were 0.91 and 0.64 for POL1 and POL2, respectively.

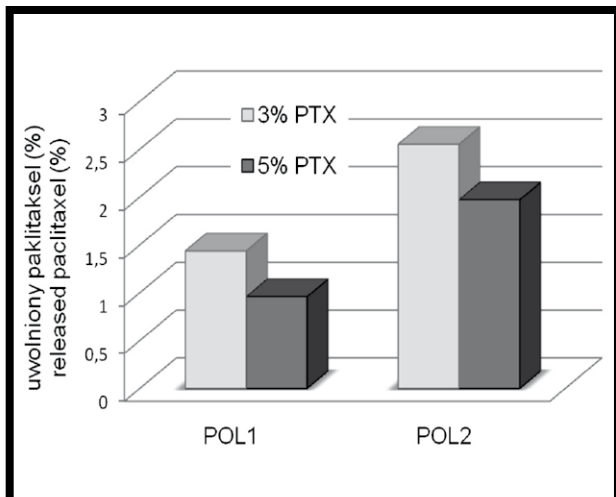
**TABELA 1. Charakterystyka kopolimerów użytych do sporządzenia matryc.**  
**TABLE 1. Characterization of copolymers used to prepare matrices.**

Rodzaj kopolimeru Type of copolymer	M <sub>n</sub> (Da)	D	Średnie długości łańcuchów The average length of sequences	R	T <sub>g</sub> (°C) <sup>A</sup>	T <sub>m</sub> (°C) <sup>B</sup>	ΔH <sub>m</sub> (J/g)
poly(L-lactide-co-TMC) (70:30) – POL1	47 800	2.0	$I_{LL} = 3.1$ $I_{TMC} = 1.3$	0.91	42	-	-
poly(L-lactide-co-TMC) (70:30) – POL2	61 200	2.6	$I_{LL} = 3.4$ $I_{TMC} = 1.7$	0.64	43	158	29

M<sub>n</sub> – liczbowo średni ciężar cząsteczkowy;  $I_{LL}$ ,  $I_{TMC}$  – średnia długość jednostek laktydylowych i węglanowych;  
 R – współczynnik randomizacji, T<sub>g</sub> – temperatura zeszklenia, T<sub>m</sub> – temperatura topnienia, ΔH<sub>m</sub> – entalpia topnienia  
 M<sub>n</sub> – number average molecular weight;  $I_{LL}$ ,  $I_{TMC}$  – average length of lactidyl and carbonate sequences;  
 R – randomisation ratio, T<sub>g</sub> – glass-transition temperature, T<sub>m</sub> – melting temperature, ΔH<sub>m</sub> – melting enthalpy

<sup>A</sup> drugi skan DSC / second DSC scan

<sup>B</sup> pierwszy skan DSC / first DSC scan



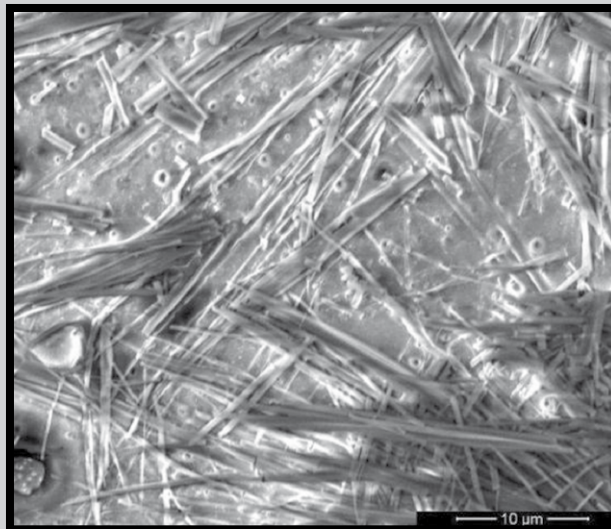
**RYS. 1. Procentowa ilość paklitakselu uwolnionego z matryc wykonanych z POL1 i POL2 podczas 15 tygodni degradacji.**

**FIG. 1. The percentage amount of paclitaxel released from POL1 and POL2 matrices during 15 weeks of degradation.**

W czasie 15 tygodni degradacji hydrolitycznej nie odnotowano znaczących zmian w mikrostrukturze matryc, niezależnie od zawartości paklitakselu. Obserwowano jedynie niewielki wzrost zawartości jednostek laktydylowych przy jednoczesnym ubytku jednostek węglanowych, co jest charakterystyczne dla kopolimerów PLATMC z wysoką zawartością jednostek węglanowych [7].

Monitorowano ilość uwalnianego paklitakselu. Uzyskane wyniki pokazały, iż więcej leku uwolniło się z matryc otrzymanych z POL2 (RYS. 1). Może to być tłumaczone tym, iż kopolimer POL2 miał charakter semikrystaliczny z T<sub>g</sub> wynoszącą 43°C i T<sub>m</sub> 158°C (entalpia topnienia wynosiła 29 J/g). Krystaliczne regiony złożone z bloków laktydylowych mogły tworzyć kanały umożliwiające wodzie penetrację matrycy i przez to wpłynąć na większą ilość uwolnionego leku [8]. Matryce z 5% zawartością paklitakselu otrzymane z obu rodzajów kopolimerów uwolniły mniej leku niż matryce z 3% jego zawartością. Mogło to być spowodowane obecnością skupisk leku wewnątrz matrycy, do których woda miała utrudniony dostęp. Podobne skupiska obserwowano na powierzchni (RYS. 2).

Oba typy kopolimerów uwolniły bardzo małą ilość paklitakselu. Zjawisko to mogło wynikać z nieznacznych zmian mikrostruktury łańcucha kopolimerowego, które wskazują na regularny proces degradacji badanych materiałów (wyników nie pokazano). Regularna degradacja może być efektem obecności jednostek węglanowych [9].



**RYS. 2. Złogi paklitakselu – powierzchnia matrycy POL1 zawierającej 5% leku po 3 tygodniach degradacji.**

**FIG. 2. Clusters of paclitaxel - surface of POL1 matrix with 5% of drug after 3 weeks of degradation.**

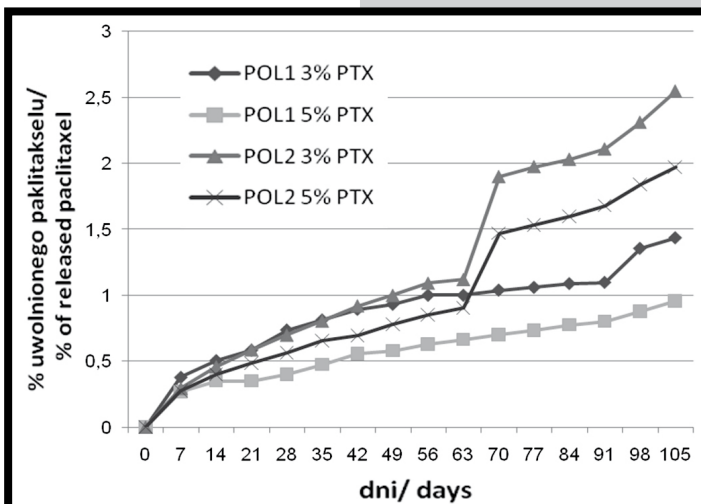
During 15 weeks of hydrolytic degradation no significant changes in chain microstructure were noticed, regardless of paclitaxel content. It was only observed that lactidyl units content slightly increased and carbonate units decreased which is characteristic for PLATMC copolymers with high lactidyl units content [7].

The amount of released paclitaxel was monitored. The obtained data showed that more drug was released from matrices made of POL2 (FIG. 1). This may be explained by the fact that copolymer POL2 was semicrystalline with T<sub>g</sub> at 43°C and T<sub>m</sub> at 158°C (melting enthalpy averaged 29 J/g). The crystalline regions composed of lactidyl blocks may have created ducts facilitating water permeation of the matrices and thus influenced higher amount of the liberated drug [8]. In the case of both polymers, matrices containing 5% of paclitaxel released less drug than matrices with 3% of PTX. It may be caused by formation of drug clusters within the matrices as those visible on the surface, where water had limited inflow (FIG. 2).

Both types of copolymers liberated very small amount of total paclitaxel. This phenomenon may be the effect of the slight changes of copolymers' chain microstructure which indicated regular degradation of studied materials (data not shown). Regular degradation may have been the effect of carbonate units content [9].



Porównano profile uwalniania paklitakselu. Zano-  
towano, iż matryce otrzy-  
mane z POL1 zapewniały  
stabilne uwalnianie przez  
cały okres inkubacji (RYS.  
3). W przypadku obu ma-  
tryc POL2 profil uwalniania  
był stabilny przez 9 tygodni,  
a następnie zaobserwowa-  
no wzrost ilości uwolnionego  
leku. W tym samym cza-  
sie nie doszło do znaczą-  
cych zmian mikrostruktury.  
Jakkolwiek, temperatura  
zeszklenia uległa obni-  
żeniu, co mogło ułatwić  
dostęp wody do wnętrza  
matrycy dzięki zwiększonej  
ruchliwości łańcuchów.



**RYS. 3. Sumaryczna ilość uwolnionego paklitakselu z matryc wykonanych z POL1 i POL2.**  
**FIG. 3. Cumulative release of paclitaxel from matrices obtained from POL1 and POL2.**

Release profiles of ma-  
trices containing paclitaxel  
were compared. It was no-  
ticed that matrices obtained  
from POL1 provided stable  
release profile during the  
whole incubation period  
(FIG. 3). In the case of  
both POL2 matrices, the  
release profile was even  
for 9 weeks and then in-  
creased amount of liberated  
paclitaxel was observed.  
In the meantime, there were  
no significant changes in  
chain microstructure. How-  
ever, glass-transition tem-  
perature decreased which  
caused polymer chains'  
mobility and thus favoured  
water permeation.

## Wnioski

Matryce z paklitakselem i matryce bez leku zostały  
przygotowane z dwóch rodzajów poli(L-laktydo-ko-węgla-  
nu trimetyleny) (70:30) zsyntezowanych w dwóch różnych  
temperaturach: 150°C i 120°C. Oba badane kopolimery  
charakteryzowały się wolną degradacją i wolnym uwalnia-  
niem paklitakselu. Mała ilość inkorporowanego leku została  
uwolniona z matrycy w ciągu 15 tygodni inkubacji. Najbardziej  
stabilny profil zapewniony był przez POL1. Z badań wynika,  
iż poli(L-laktydo-ko-węglan trimetylen) posiadający bardziej  
beładną strukturę łańcucha wydaje się być atrakcyjnym  
materiałem do tworzenia długoterminowych systemów  
kontrolowanego uwalniania paklitakselu.

## Podziękowania

Badania zrealizowano w ramach badań Śląskiego Uni-  
wersytetu Medycznego (nr: KNW-1-054/D/1/0) oraz projektu  
Narodowego Centrum Nauki (nr: NN 405 682 340).

## Conclusions

The matrices with paclitaxel and drug free matrices were  
prepared from two kinds of poly(L-lactide-co-TMC) (70:30)  
synthesised at different temperature: 150°C and 120°C.  
Both of the studied copolymers characterized regular  
degradation process and slow release profile of paclitaxel.  
Small amount of incorporated drug was liberated from ma-  
trices during 15 weeks of incubation. The most stable and  
even release profile was provided by POL1. It indicates  
that poly(L-lactide-co-trimethylene carbonate) with more  
random structure seems to be attractive material for long-  
term controlled paclitaxel delivery systems.

## Acknowledgments

This study has been financially supported by Medical  
University of Silesia in Katowice (Grant No: KNW-1-054/  
D/1/0) and National Science Centre (Grant No: NN 405  
682 340).

## Piśmiennictwo

- [1] Nair L.S., Laurencin C. T.: Biodegradable polymers as biomate-  
rials. *Progress in Polymer Science* 32 (2007) 762-798.
- [2] Williams D. F.: On the nature of Biomaterials. *Biomaterials* 30  
(2009) 5897-5909.
- [3] Pillai O., Panchagnula R.: Polymers in drug delivery. *Current  
Opinion in Chemical Biology* 5 (2001) 447-451.
- [4] Costa M. A., Simon D. I.: Molecular Basis of Restenosis and  
Drug-Eluting Stents. *Circulation* 11 (2005) 2257-2273.
- [5] Kraitzer A., Kloog Y., Zilberman M.: Approaches for Prevention  
of Restenosis. *Journal of Biomedical Materials Research Part B:  
Applied Biomaterials* 85B (2008) 583-603.
- [6] Dobrzyński P., Kasperczyk J., Janeczek H., Bero M.: Synthesis  
of Biodegradable Copolymers with the Use of Low Toxic Zirconium  
Compounds. 1. Copolymerization of Glycolide with L-Lactide Initia-  
ted by Zr(Acac)<sub>4</sub>. *Macromolecules* 34 (2001) 5090-5098.

## References

- [7] Hua J., Gębarowska K., Dobrzyński P., Kasperczyk J., Wei J.,  
Li S.: Influence of chain microstructure on the hydrolytic degrada-  
tion of copolymers from 1,3-trimethylene carbonate and L-lactide.  
*Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry* 47 (2009)  
3869-3879.
- [8] Urata T., Arimori K., Nakano M.: Modification of release rates  
of cyclosporin A from poly(L-lactic acid) microspheres by fatty  
acid esters and in-vivo evaluation of the microspheres. *Journal of  
Controlled Release* 58 (1999) 133-141.
- [9] Zhang Z., Kuijer R., Bulstra S. K., Dirk W. Grijpma D. W., Feijen J.:  
The in vivo and in vitro degradation behavior of poly(trimethylene  
carbonate). *Biomaterials* 27 (2006) 1741-1748.